

# Thesis

MUNICH

1967

ZUR REGULATION DER  
CHOLESTERINSYNTHESE:

SCHILDDRÜSENFUNKTION UND  
HMG-CoA-REDUKTASE DER  
RATTENLEBER

Walter Guder

LANE MEDICAL LIBRARY OF  
STANFORD UNIVERSITY  
300 PASTEUR  
PALO ALTO, CALIFORNIA





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik München

Direktor : Professor Dr. Dr. G. Bodechtel.

## ZUR REGULATION DER CHOLESTERINSYNTHESE:

Schilddrüsenfunktion und HMG-  
CoA-Reduktase der Rattenleber.

Inaugural - Dissertation zur  
Erlangung der Doktorwürde in der gesamten  
Medizin, verfasst und einer Hohen Medizinischen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
zu München vorgelegt von

WALTER GUDER

aus München

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Referent: Prof.Dr. O. Wieland  
Correferent: Prof.Dr.Dr.G. Bodechtel  
Dekan: Prof.Dr.M. Kiese  
Tag der mündlichen  
Prüfung: 21.2.1967

Meinen Eltern



# I n h a l t :

## I. Einleitung

1

## II. Ergebnisse:

1. Untersuchungen über den Mevalonsäuregehalt der Rattenleber. 8
2. Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase in Lebermikrosomen normaler Ratten. 15
3. Die Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase in hypo- und hyperthyreoten Ratten. 21
4. Das Verhalten der HMG-CoA-Reduktase in der perfundierten Rattenleber. 27
5. Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase hypothyreoter Ratten nach einmaliger Injektion von  $50 \mu\text{g T}_3$ . 29
6. Untersuchungen über die Lokalisation der HMG-CoA-Reduktase in den Leberzellen. 31

## III. Diskussion:

1. HMG-CoA-Reduktase, Cholesterinsynthese und Mevalonsäurespiegel der Rattenleber. 37
2. Beziehungen zwischen HMG-CoA-Reduktase und Schilddrüsenfunktion. 40
3. Diskussion der Ergebnisse im Rahmen des heutigen Wissens über die Thyroxinwirkung und den Cholesterinstoffwechsel. 47

## IV. Experimenteller Teil:

- A. Haltung und Behandlung der Versuchstiere.
  1. Gruppenbildung. 56
  2. Erzeugung von Hypothyreose und Hyperthyreose. 57
- B. Versuche zur Bestimmung der Mevalonsäure in der Rattenleber.
  1. Gewinnung der Leberextrakte. 59
  2. Optischer Test zur Bestimmung der Mevalonsäure 59

## II

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. Reinigung der Mevalonatkinase aus Hefe.                                              | 60  |
| 4. Infusion von $^{14}\text{C}$ -Acetat in die vena portae<br>der narkotisierten Ratte. | 65  |
| C. Versuche zum HMG-CoA-Reduktasetest mit $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA.                     |     |
| 1. Synthese von HMG-CoA.                                                                | 67  |
| 2. Synthese von 5- $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA.                                            | 68  |
| 3. HMG-CoA-Reduktasetest mit 5- $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA.                               | 77  |
| 4. Gewinnung mikrosomaler Untereinheiten im<br>Sucrosedichtegradienten.                 | 83  |
| D. Statistische Berechnung.                                                             | 85  |
| Zusammenfassung.                                                                        | 86  |
| Abkürzungen                                                                             | III |
| Literatur                                                                               | V   |
| Lebensdaten                                                                             | XX  |

---

### III

#### A b k ü r z u n g e n :

|                           |                                                 |
|---------------------------|-------------------------------------------------|
| ADP / ATP                 | Adenosindiphosphat / Adenosintriphosphat        |
| CoA                       | Coenzym A                                       |
| E                         | Extinktion                                      |
| EDTA                      | Aethylendiamintetraessigsäure                   |
| EE                        | Enzymeinheit                                    |
| g.                        | Gramm                                           |
| G-6-P                     | Glukose-6-Phosphat                              |
| G-6-PDH                   | Glukose-6-Phosphatdehydrogenase                 |
| h                         | Stunde                                          |
| HMG-CoA                   | $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA   |
| Ipm                       | Impulse pro Minute                              |
| LDH                       | Laktatdehydrogenase                             |
| M                         | Molar, Mol                                      |
| mC / $\mu$ C              | Millicurie / Mikrocurie                         |
| mE                        | Millieinheit                                    |
| mg / $\mu$ g              | Milligramm / Mikrogramm (Gamma)                 |
| mM / $\mu$ M / m/ $\mu$ M | Millimol / Mikromol / Nanomol                   |
| MVS                       | Mevalonsäure                                    |
| NAD / NADP (H)            | Nicotinadenindi- (tri)nukleotid (reduziert)     |
| P / PP                    | Phosphat / Pyrophosphat                         |
| PBJ                       | Proteingebundenes Jod                           |
| PEP                       | Phosphoenolpyruvat                              |
| PK                        | Pyruvatkinase                                   |
| T <sub>3</sub>            | Trijodthyronin                                  |
| Tbl.                      | Tabletten                                       |
| Thyr. sicc.               | Thyreoidea sicca                                |
| Tram / Tris               | Triäthanolamin / Trishydroxymethyl-aminomethan. |



## I. Einleitung.

1894 beobachtete v. Eiselsberg (43) die Auswirkungen der totalen Schilddrüsenexstirpation bei Schafen und Ziegen. Dabei fand er auffällige Arterienveränderungen im Sinne einer Arteriosklerose. Wenige Jahre später wurden auch bei Menschen mit angeborener Schilddrüsenaplasie oder postoperativem Myxoedem stärkere Verfettungen der Organe (1,76,87,99) und arteriosklerotischen Veränderungen der großen Gefäße gefunden (76,100). Die in derart veränderten Gefäßen lagernden doppelbrechenden Substanzen wurden 1910 als Ester des Cholesterins erkannt (166), das - seit seiner Entdeckung in Gallensteinen (32,52,62) als " substance feuilleté, lamelleuse, brillante ..." (de Fourcroy 1789) bekannt - in seiner Bedeutung und chemischen Zusammensetzung jedoch noch nicht erforscht war (88). Die Aufklärung der chemischen Konstitution durch H. Wieland (161) und A. Windaus (167), genauere Nachweismethoden ( 9,165 ) und der Beweis, daß der Tierkörper Cholesterin selbst synthetisieren kann (36,56,124), ermöglichten eine genauere Erforschung der vermuteten Zusammenhänge zwischen Arteriosklerose und Schilddrüsenfunktion.

Bing und Heckscher fanden 1925 mit Hilfe einer nephelometrischen Methode (9), daß der "Fettcholesteringehalt" des Blutes vom Funktionszustand der Schilddrüse abhängig ist. Bei histologisch gesicherten Hyperthyreosen fand sich ein an der unteren Grenze der Norm liegender Cholesterinspiegel, der nach Strumektomie anstieg (10). Bei echten

Hypothyreosen dagegen lag der Spiegel meist über der Norm. (69,70,101,123) Diese Beobachtungen führten, gemeinsam mit pathologisch anatomischen Befunden (78,104,156), zu der Auffassung, daß die Schilddrüse einen arteriosklerosehemmenden Effekt durch Senkung des Serumcholesterinspiegels ausübe (76,154). Tierversuche bestätigten diese Vorstellung: Durch Cholesterinfütterung induzierbare Arteriosklerosen konnten durch gleichzeitige Fütterung von Jod (21), Schilddrüsenextrakten (153) oder reinem Thyroxin (85) verhindert werden. Die Aufklärung der Mechanismen, die diesen Effekt bewirkten, setzte eine genauere Kenntnis der Biosynthese, des Abbaus und der Regulation des Serumcholesterins im Tierkörper voraus. Rittenberg und Schoenheimer (120) sowie Sonderhoff und Thomas (135) leiteten 1937 mit ihren Arbeiten über den Einbau von schwerem Wasser und  $^3\text{H}$ -markiertem Acetat in Cholesterin die Erforschung der Biosynthese ein. Sie wurde in den Laboratorien Blochs (16,17), Lynens und Popjaks fortgesetzt und galt 1959 bis auf wenige Fragen als abgeschlossen. (Zusammenfassungen: 13,60,93,95.)

Die Cholesterinsynthese läßt sich, wie Abb.1 in einem vereinfachten Schema zeigt, in drei Phasen unterteilen:

1. Die Bildung der Mevalonsäure aus beta-Hydroxy-beta-methyl-glutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) geschieht durch Reduktion unter Coenzym A - abspaltung mit Hilfe des aus Hefe (41,47,48,81) und Leber (26) isolierten Enzyms HMG-CoA-Reduktase. HMG-CoA, das die Verbindung der Cholesterinsynthese mit dem Abbau der verzweigten Amino-

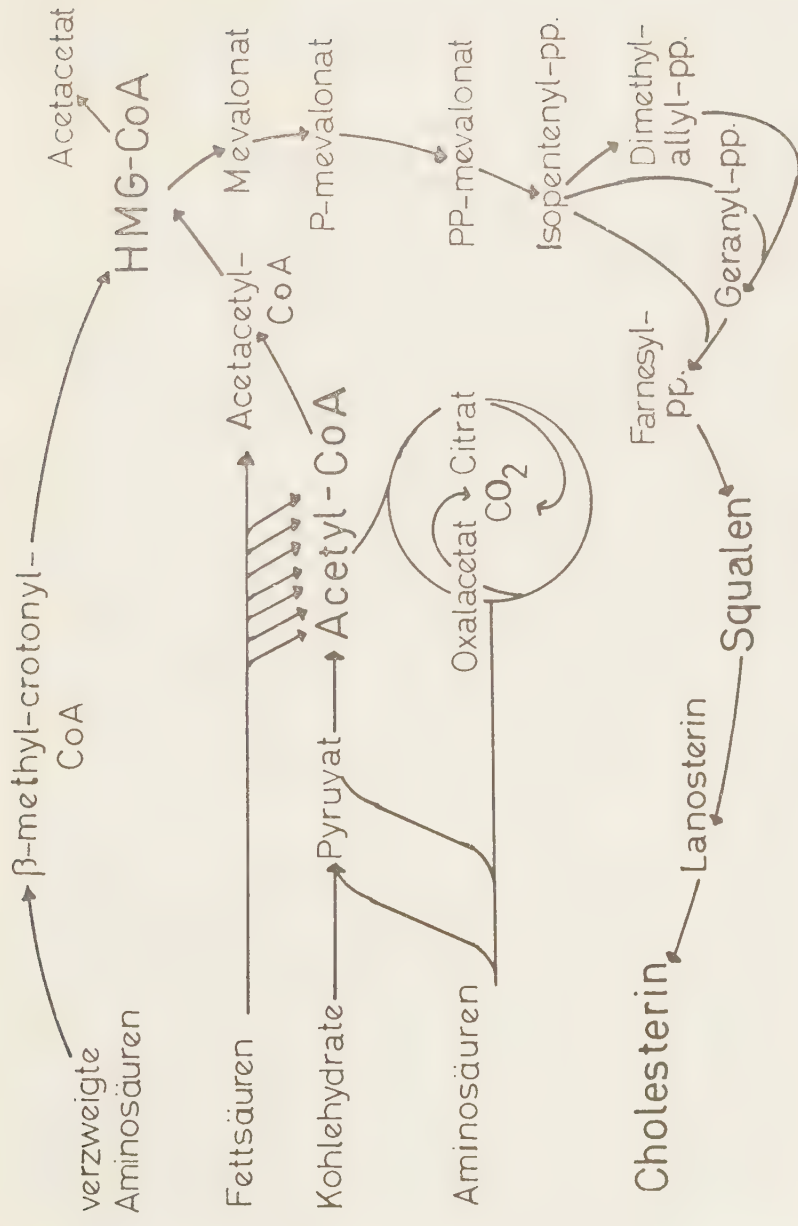


Abb.1: Cholesterinsynthese im Stoffwechsel der Leberzelle.

säuren (74,75,82,97) und der Ketogenese (96,122,163) herstellt, entsteht seinerseits durch Kondensation aus drei Molekülen Acetyl-CoA (96,98).

2. Durch zweifache Phosphorylierung (72,89,152) und unter  $\text{CO}_2$ -abspaltung (33,38) entsteht das "aktive Isopren" Isopentenylpyrophosphat (15,42), das nach Umlagerung der Doppelbindung (2,3) in Kondensationsreaktionen zu Polyisoprenoiden umgewandelt wird (94). Zwei Moleküle des dabei gebildeten Triterpens Farnesylpyrophosphat (94) lagern sich unter Abspaltung der Phosphatgruppen "Kopf gegen Kopf" aneinander und bilden das Squalen.

3. In einem komplexen Reaktionsmechanismus, der an die Strukturen der lebenden Zelle und die oxydative Phosphorylierung gebunden ist, kommt es zur Cyclisierung des Squalens (13). Das Produkt dieser Reaktion ist das Steroid Lanosterin, welches in vierzehn weiteren - teilweise noch hypothetischen - Schritten zu Cholesterin umgewandelt wird.

Der Abbau des Cholesterins wurde schon in den 30 er Jahren erforscht. Dam (36), Page (112) sowie Schoenheimer und Breusch (125) schlossen aus ihren Bilanzversuchen, daß der tierische Körper Cholesterin abbaut. Als Hauptabbauprodukte wurden die Gallensäuren erkannt (14,128), welche durch oxydative Verkürzung der Seitenkette um drei C-Atome entstehen. Daneben kann das Cholesterin jedoch auch unverändert ausgeschieden werden (136), oder es wird zu Steroidhormonen umgewandelt (12,171). Das Steranskelett wird nicht

gespalten (14). Die abgespaltenen Kohlenstoffatome der Seitenkette werden im  $\text{CO}_2$  der Expirationsluft wiedergefunden (31,103).

Nachdem von biochemischer Seite die Wege der Synthese und des Abbaus der Steroide aufgezeigt waren, begann erneut die Erforschung der Physiologie des Cholesterinstoffwechsels im Tierkörper. Im Zusammenhang mit dem Arterioskleroseproblem wurde dabei der Regulierung des Serumcholesterinspiegels besonderes Interesse entgegengebracht.

Eyers (30) und Gould (59) wiesen zu Beginn der fünfziger Jahre nach, daß Auf- und Abbau des Serumcholesterins in der Leber stattfinden. Zwar bilden auch fast alle anderen Gewebe wie Haut, Darm (114,138), Niere, Gonaden und Nebenniere (137) Cholesterin aus Acetat, doch geben diese, vielleicht mit Ausnahme des Darmes (90), keine messbaren Mengen an das zirkulierende Blut ab. Die Regulation des Serumcholesterins mußte also vorwiegend an die Leber gebunden sein. Tatsächlich unterliegen sowohl Synthese wie Abbau und Ausscheidung in der Leber einer Vielzahl von Regelmechanismen, die in ihrer Gesamtheit einen konstanten Serumspiegel gewährleisten. Da die Bedeutung dieser Faktoren noch nicht vollständig geklärt ist und ihre Anzahl den Rahmen dieser Einleitung sprengen würde, können sie hier nicht im einzelnen aufgeführt werden. Die wesentlichsten und bisher am sichersten fundierten Ergebnisse werden später gemeinsam mit den eigenen Beobachtungen diskutiert. Nur die Arbeiten, welche direkt oder indirekt zur Fragestellung dieser Dissertation

führten, seien im folgenden kurz erwähnt.

Erste Hinweise auf eine Regulierung der Synthese gaben Tomkins und Mitarb. (151), die beobachteten, daß der Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in Cholesterin bei oraler Zufuhr von Cholesterin stark gehemmt ist.  $^{14}\text{C}$ -mevalonsäure wird jedoch, wie spätere Versuche zeigten, unter gleichen Bedingungen in normaler Menge in Cholesterin eingebaut (25,130). Auch Thyroxin scheint die Synthese in ähnlicher Weise zu beeinflussen: Fletscher und Myant (49) fanden eine Hemmung des Acetateinbaus, nicht aber des mevalonateinbaus in Cholesterin in Lebern hypothyreoter Tiere. Beide Autoren schlossen aus ihren Experimenten, daß die Faktoren, welche die Cholesterinsynthese steuern, vor der Bildung der mevalonsäure eingreifen müssen (siehe Schema Abb. 1). Durch Messungen der einzelnen Enzyme, die an der Bildung der mevalonsäure aus Acetat beteiligt sind, wurde die HMG-CoA-Reduktase als das die Synthese limitierende Enzym erkannt (25,27,129). Damit gewann dieses Enzym bei der Erforschung der Beziehungen zwischen Schilddrüsenfunktion und Cholesterinstoffwechsel besonderes Interesse. Die Möglichkeit, mit Hilfe eines neuen Tests (117) die HMG-CoA-Reduktase direkt zu messen, gab die Anregung zu den Untersuchungen, die Gegenstand dieser Arbeit sind.

Dabei werden vier Fragenkomplexe behandelt:

1. Ist die bei der Reduktion von HMG-CoA entstehende Mevalonsäure in messbaren Mengen in der Leber enthalten?
2. Besteht eine Beziehung zwischen Funktionszustand der Schilddrüse und der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase?
  - a. Wie verhält sich das Enzym bei Hypothyreose?
  - b. Wie verhält sich das Enzym bei parenteraler Zufuhr von Trijodthyronin?
3. Läßt sich die HMG-CoA-Reductase bei Perfusion der isolierten Leber durch Schilddrüsenhormone aktivieren?
4. An welche Strukturen der Zelle ist die HMG-CoA-Reduktase gebunden?

-----

## II. Ergebnisse.

### 1. Untersuchungen über den Mevalonsäuregehalt der Rattenleber.

1959 fand Löffler (91) in normalen und diabetischen Rattenlebern Mevalonsäurespiegel zwischen 89 und 434 nMol/g Frischgewicht. Diese Ergebnisse konnten von N. Bucher (23) nicht bestätigt werden: Sie fand mit einem Isotopenverdünnungstest kaum messbare Spiegel an Mevalonsäure. Aktivitätsmessungen der am Umsatz der Mevalonsäure beteiligten Enzyme ergaben weit höhere Aktivitäten der Mevalonsäure verbrauchenden Mevalonatkinase (72,89,152) gegenüber der Mevalonsäure bildenden HMG-CoA-Reduktase (26,81). Auch dieses Ergebnis ließ Zweifel an der Existenz höherer Mevalonsäurespiegel im Lebergewebe aufkommen (28).

Zur Klärung dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit die von Löffler verwendete Methode überprüft und durch Isotopenversuche ergänzt.

a.) Zunächst wurde versucht, durch Wiederholung der enzymatischen Messungen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die Reinigung der Mevalonatkinase aus Hefe nach Henning (72) brachte gleiche spezifische Aktivitäten wie in der Originalarbeit angegeben (72). Die nach der zweiten Ammonsulfatfraktionierung noch störende Verunreinigung erwies sich, wie auch Tschen (152) feststellte, als ATP spaltende Phosphatase. Die auf ihren Mevalonsäuregehalt zu prüfenden Lebern wurden durch Gefrierstop entnommen und mit 1 M Perchlorsäure ( Trichloracetat hemmt die Mevalonatkinase

vollständig) homogenisiert. Der saure Extrakt konnte nach Atherperforation durch Ausschütteln mit KOH gereinigt werden. In der so erhaltenen wässrigen Phase war zugesetzte Mevalonsäure zu 90 % enthalten. Es wurden jeweils vier Ratten gleichzeitig auf ihren Lebermevalonsäurespiegel untersucht. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle A zusammengefaßt.

Tab. A : Messungen der Mevalonsäure nach Löffler (91)  
in 12 normalen Rattenlebern.

| Gruppe | Tier Nr. | Gewicht (g) | Mevalonsäure ( nmol/g ) |                    |
|--------|----------|-------------|-------------------------|--------------------|
|        |          |             | 1.                      | 2.                 |
| 1.     | 1.       | 315         | 84                      |                    |
|        | 2.       | 335         | 16,5                    |                    |
|        | 3.       | 111         | 17,0                    |                    |
|        | 4.       | 102         | 33,0                    |                    |
| 2.     | 5.       | 400-500     | 13,0                    | 253,2 <sup>§</sup> |
|        | 6.       | 400-500     | 21,1                    | 45,0               |
|        | 7.       | 400-500     | 11,0                    | 152,2 <sup>§</sup> |
|        | 8.       | 400-500     | 13,0                    | 60,0               |
| 3.     | 9.       | 110         | 40,5                    | 11,1               |
|        | 10.      | 102         | verloren                |                    |
|        | 11.      | 311         | 46,6                    | 17,1               |
|        | 12.      | 101         | 50,5                    | 11,1               |

§) Zugabe von 240 n Mol pro g Leber vor der Extraktion.

Dabei wurden folgende Beobachtungen gemacht:

1. Die Ergebnisse innerhalb einer Gruppe sind sehr ähnlich, obwohl die Gruppe bewußt aus Ratten verschiedenen Alters und Geschlechts gebildet wurden. Von Gruppe zu Gruppe treten jedoch größere Differenzen auf (Gruppe 1.-3., Spalte 1.)
2. Die Messwerte liegen zwischen 19 und 89 nMol/g Frischgewicht.
3. Von den Extrakten der Gruppe 2 wurden 24 Stunden nach der ersten Messung erneut Proben ätherperforiert und ihr Mevalonsäuregehalt gemessen. Extrakt 5 und 7 erhielten einen Zusatz von je 240 nMol reiner Mevalonsäure pro Gramm Leber vor der Reinigung.  
Die Ergebnisse lagen jetzt höher als bei der ersten Messung; die zugesetzte Mevalonsäure wurde zu etwa 90 % wiedergefunden.
4. Die sauren Exakte der Gruppe 3 wurden bei  $-20^{\circ}$ ,  $+2^{\circ}$  und  $+20^{\circ}$  Celsius aufbewahrt. Die nach zwei Tagen durchgeführte 2. Messung ergab niedrigere Werte, die jedoch, unabhängig von der Aufbewahrungstemperatur, untereinander wieder gleich waren.

Aus diesen Ergebnissen musste gefolgert werden, daß die Methode zur exakten Bestimmung des Mevalonsäurespiegels ungeeignet ist. Um unspezifische, den Test beeinflussende Faktoren auszuschließen, war es notwendig, den Aetherextrakt oder die verwendete Mevalonatkinase weiter zu reinigen.

Zunächst wurde die Mevalonatkinase weiter gereinigt: Die Isolierung des Enzyms aus Hefe nach Henning wurde nach dem Hitzschritt unterbrochen, und die enzymhaltige Lösung an einen Anionenaustauscher gebunden. Sowohl DEAE-Zellulose wie auch DEAE-Sephadex ergaben ein Enzym von 3-5 facher spezifischer Aktivität, das fast vollständig von der schwer zu trennenden ATP-ase gereinigt war. Für die folgenden Untersuchungen wurde ein aus DEAE-Zellulose mit stufenweiser Elution gewonnenes Enzym verwendet (67).

Wiederum aus acht Rattenlebern hergestellte Extrakte zeigten diesmal ein völlig anderes Ergebnis. Obwohl die beim Homogenisieren ( in zwei Fällen) zugesetzte Mevalonsäure wie früher wiedergefunden werden konnte, waren alle "reinen" Extrakte frei von Mevalonsäure. Nachträglich zugesetztes Substrat verursachte einen sofortigen Reaktionsablauf. Aus diesem Ergebnis war damit bewiesen, daß es sich bei den früher gemessenen hohen "Mevalonsäure"-spiegeln um ungeklärte nicht spezifische Begleitreaktionen handeln musste.

b.) Nachdem der Nachweis von Mevalonsäure in der Rattenleber mit gereinigter Mevalonatkinase nicht gelungen war, sollte die Verwendung von Isotopen zum Nachweis enzymatisch nicht mehr messbarer Mengen dienen. Denn wenn  $^{14}\text{C}$ -Acetat, wie in vielen Arbeiten nachgewiesen worden ist (22,77,162,169), von der Rattenleber in vivo, aber auch von der Leberschnitte (164) und dem Homogenat (24), sehr rasch in Cholesterin eingebaut wird, muss die Radioaktivität auch im Zwischenprodukt, der Mevalonsäure, nachweis-

bar sein, wenn sich diese in messbarer Menge in der Zelle anhäuft (118).

In zwei Versuchen mit normalen Ratten wurden 38 und 75 Mikrocurie  $^{14}\text{C}$ -Acetat (spez. Akt. 35-40 mC/mM) in 1 ml Flüssigkeit während 40 Minuten in einen freipraeparierten Ast der Pfortader infundiert. Mit Entnahme von Lebergewebe durch Gefrierstop und Aspiration von Blut aus Herz und Bauchhöhle zur Messung der Radioaktivität war der Versuch nach 45 Minuten beendet. Die durch saure Extraktion und Aetherperforation gewonnenen Leberextrakte wurden dann nach einem von Swim und Utter (143) angegebenen Verfahren an Kieselgur (Celite) gebunden und mit Chloroform eluiert. Zur enzymatischen und titrimetrischen Erkennung der Mevalonsäure wurde dem Homogenat unmarkierte Mevalonsäure zugesetzt (48,83). Die Messungen der Radioaktivität und deren Verteilung auf die einzelnen Fraktionen der Leber sind der Tabelle B zu entnehmen. Eine der beiden Celite-Elutionen zeigt die Abb. 2 (Seite 14).

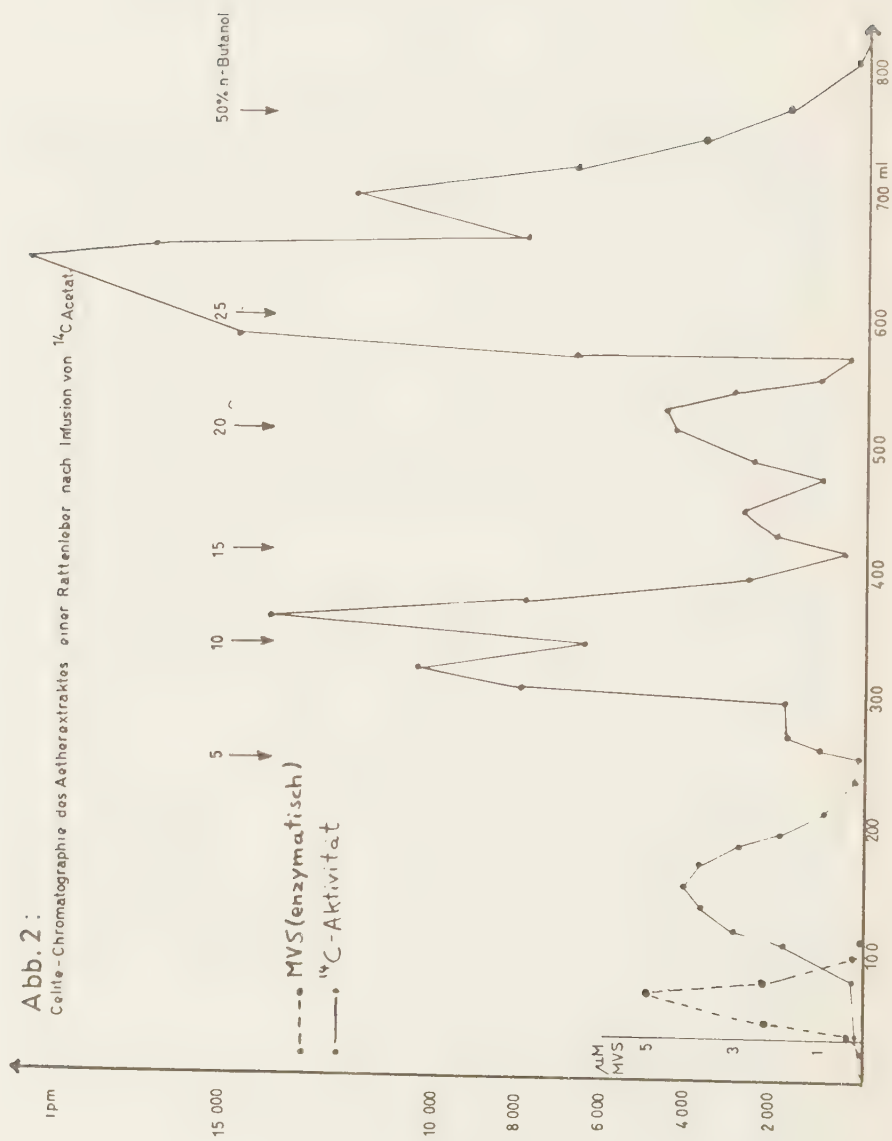
Nach 45 Minuten kreiste nur noch 2,4% der infundierten Radioaktivität im Blut, 3,8 bzw 5,4 % waren in der Leber enthalten, davon jedoch nur ein auffallend geringer Teil als Acetat, ein Hinweis auf den schon früher beobachteten schnellen Umbau freier Essigsäure durch die Leber (46,162). Die Auftrennung des Aetherextraktes mit Hilfe der Celitechromatographie ergab eine Vielzahl radioaktiv markierter Substanzen, von denen jedoch nur die Essigsäure identifiziert wurde. Diejenigen Fraktionen, welche enzymatisch und titrimetrisch Mevalonsäure enthielten, zeigten keine Radioaktivität.

Tabelle B : Messungen der Radioaktivität zweier Ratten-  
lebern nach Infusion von  $^{14}\text{C}$ -Acetat.

|                                     | Versuch I        |      | Versuch II       |      |
|-------------------------------------|------------------|------|------------------|------|
| $^{14}\text{C}$ -Acetat(infundiert) | 30 microcurie    |      | 75 microcurie    |      |
| Radioaktivität §                    | lpm              | %    | lpm              | %    |
| Gesamt                              | $5 \cdot 10^6$   | 100  | $3,7 \cdot 10^6$ | 100  |
| Nach 45' im Blut                    | $1,2 \cdot 10^6$ | 2,4  | $1,63 "$         | 1,9  |
| Leber gesamt                        | $1,9 \cdot 10^6$ | 3,8  | $5,2 \cdot 10^6$ | 5,4  |
| Saurer Extrakt                      | $1,4 \cdot 10^6$ | 2,8  | $4,15 "$         | 4,3  |
| davon aetherlöslich                 | $1,8 \cdot 10^5$ | 0,36 | $3,6 \cdot 10^5$ | 0,37 |
| davon Acetat                        | 12 300           |      | 31 700           |      |
| nicht Acetat                        | $1,7 \cdot 10^5$ |      | $3,3 \cdot 10^5$ |      |

§) Alle Radioaktivitätsmessungen wurden unter gleichen  
Bedingungen im Packard Tri Carb L. S. C. gemessen.

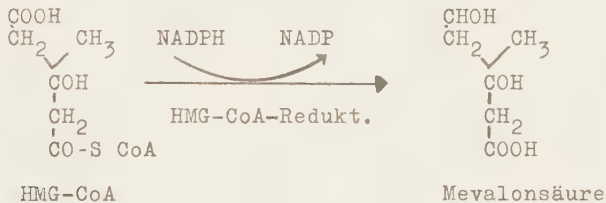
Dieses Ergebnis ließ den Schluss zu, daß Mevalonsäure  
nicht in messbaren Mengen in der Leberzelle vorkommt,  
sondern daß sie gleich nach ihrer Entstehung in die akti-  
vierte Form übergeht und zur Terpenoidsynthese verwendet  
wird.



## 2. Die Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase in Lebermikrosomen.

Die Mevalonsäure entsteht durch Reduktion des beta-Hydroxy-beta-methylglutaryl-Coenzym A mit Hilfe der NADPH-abhängigen HMG-CoA-Reduktase (47,81) (s. Gleichung 1). Erste Messungen dieses Enzyms in der Rattenleber ergaben sehr unterschiedliche Werte: Die Messung mit einem HMG-CoA-liefernden Enzymsystem aus *clostridium cluyveri* erbrachte weit höhere Aktivitäten als direkte Bestimmungen mit  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA (28,91, 117,163).

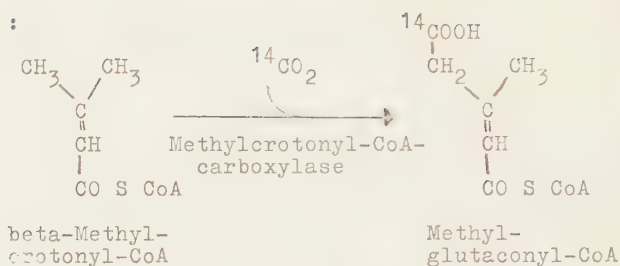
Gleichung 1 :



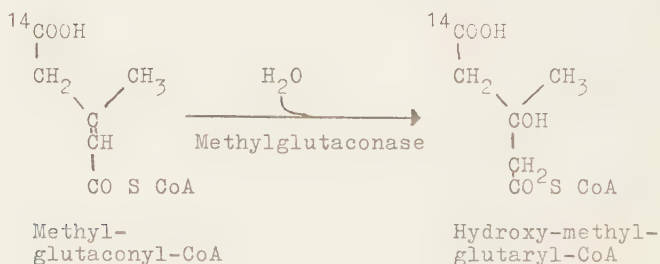
Um die durch nicht kristalline Enzyme und indirekte Substratbestimmungen sehr störungsanfällige optische Bestimmungsmethode zu umgehen, wurde 5- $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA synthetisiert und die nach Inkubation mit HMG-CoA-Reduktasehaltigen Lebermikrosomen gebildete  $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure direkt gemessen. (48,83,117).

5- $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA konnte durch Bindung von  $^{14}\text{CO}_2$  an beta-Methylcrotonyl-CoA (Gleichung 2) (82,97) und Umsetzung mit Methylglutaconase (Gleichung 3) (74) gewonnen werden. (Einzelheiten im experimentellen Teil.)

Gleichung 2 :



Gleichung 3 :



Das Reaktionsprodukt wurde nach alkalischer Hydrolyse und Zugabe definierter Mengen unmarkierter HMG-säure celite-chromatographisch identifiziert. Dabei fanden sich 55 % der Radioaktivität in der HMG-säure, die restlichen 45 % in einem zweiten Gipfel, der Methylglutarsäure darstellt. Acetat, Acetacetat oder Mevalonat waren nicht radioaktiv markiert. Die Papierchromatographie des Reaktionsproduktes nach Stadtman (139,140) zeigte einen einheitlichen Gipfel für UV-Absorption, indirekte Nitroprussidreaktion (65) und Radioaktivität.

Das so erhaltene Substrat wurde mit nicht markiertem nach Hilz u. a. (74) synthetisiertem HMG-CoA verdünnt und in den Test eingesetzt. Die bei der Inkubation mit Cofaktoren und einer Lebermikrosomenfraktion entstehende 5-<sup>14</sup>C-Mevalonsäure konnte durch Celitechromatographie (143) isoliert und ihre Radioaktivität gemessen werden.

Eine Prüfung des Systems ergab die für HMG-CoA-Reduktase typische Abhängigkeit von NADPH, wie aus Tabelle C zu entnehmen ist.

Tabelle C : Messung der HMG-CoA-Reduktase in Lebermikrosomen: Abhängigkeit von Cofaktoren.

|                                 |      |     |
|---------------------------------|------|-----|
| Kompletter Ansatz §             | 3600 | 1µm |
| ohne Mikrosomen                 | 451  | "   |
| ohne Glukose-6-phosphat         | 447  | "   |
| ohne Zwischenferment ( G-6-PDH) | 695  | "   |
| ohne NADP                       | 540  | "   |

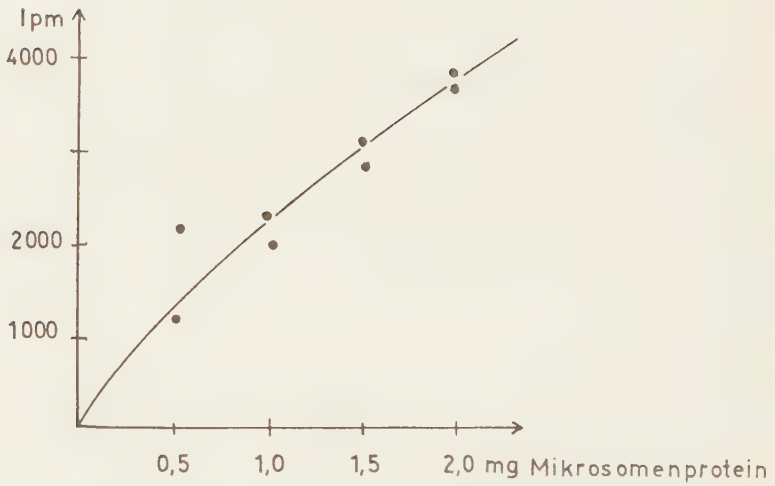
§ Der komplette Ansatz enthält: (Angaben in Mikromol)

|                       |                                                  |
|-----------------------|--------------------------------------------------|
| Tris HCl pH 7,2 : 100 | Zwischenferment : 5 µg                           |
| K-EDTA : 20           | HMG-CoA : 0,15                                   |
| Cystein HCl pH 7: 10  | 5- <sup>14</sup> C-HMG-CoA : 1,1 10 <sup>5</sup> |
| Albumin : 0,5 mg      | 1µm                                              |
| Glucose-6-phosph: 10  | Lebermikrosomen : 0,5 - 2 mg Protein             |

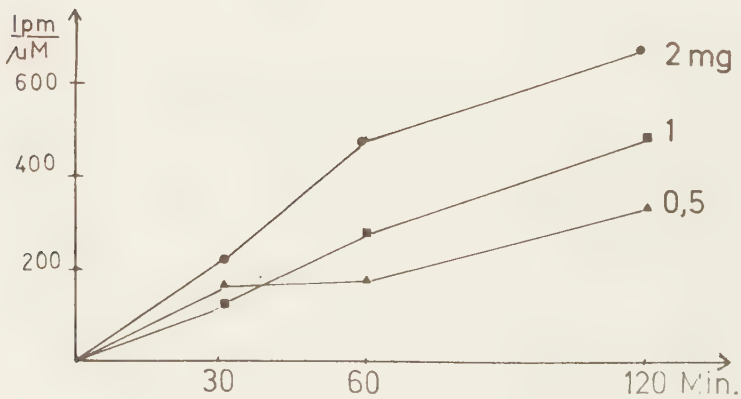
Testvolumen: 1 ml      Testzeit : 1 h      Temperatur : 37°C

Bei Einsatz verschiedener Enzymmengen zeigte sich eine fast lineare Abhängigkeit zwischen Proteinmenge und der Radioaktivität in der isolierten Mevalonsäure (s.Abb.3a).

Abb.3



a. Abhängigkeit der Mevalonsäurebildung von der Enzymmenge.



b. Abhängigkeit der Mevalonsäurebildung von der Zeit bei Einsatz verschiedener Enzymmengen.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität erwies sich der Doppelversuch mit ein und zwei Milligramm Mikrosomenprotein als nützlich. Durch die leichte Abflachung der Eichkurve im oberen Bereich lag der 2 mg-Wert meist etwas niedriger als der doppelte 1 mg-Wert. Daß es sich bei dieser Abflachung nicht um falsch niedrige Werte durch Substratmangel handelt, wie es zum Beispiel beim Einsatz von Mitochondrien durch die HMG-CoA-Desmolase eintritt (28), konnte durch Inkubation verschiedener Enzymmengen über zwei Stunden ausgeschlossen werden. Wie Abbildung 3 b zeigt, steigt die Radioaktivität der gebildeten Mevalonsäure während der zwei Stunden linear an. Eine Prüfung verschiedener Zellfraktionen auf ihren HMG-CoA-Reduktasegehalt zeigte, wie schon N. Bucher gefunden hatte (24,26), daß das Enzym fast ausschließlich an den mikrosomalen Anteil der Zelle gebunden ist. Der partikelfreie Überstand enthielt keine Aktivität. Aus diesem Grunde wurden immer gleiche Proteinmengen der mikrosomalen Fraktion in den Test eingesetzt und, um die Ergebnisse auf die Frischlebergewichte beziehen zu können, der Gehalt der Leber an Mikrosomenprotein mitbestimmt. Das Ergebnis für 8 Normaltiere ist in Tabelle D aufgeführt. Die Tabelle enthält ausserdem noch die zum Vergleich mit thyreoidektomierten Tieren gemessenen Werte für das proteingebundene Jod(126). Da der Proteingehalt der Mikrosomen von Tier zu Tier zwischen 13,3 mg und 15,5 mg pro g Leber schwankte, ergaben sich Differenzen zwischen den auf mg Protein und den auf g Leber bezogenen Werten.

Die Aktivität in den Lebermikrosomen betrug durchschnittlich 3,6 mE/mg Protein. Dieser Wert entspricht bei einem mittleren Mikrosomenproteingehalt von 13,99 mg/g Leber einer Aktivität von 50,4 mE/g Leberfrischgewicht.

Tabelle D : HMG-CoA-Reduktase bei acht normalen Ratten verschiedenen Alters und Gewichts.

| Tier Nr.         | Gewicht<br>g | PBJ<br>µg % | HMG-CoA-Reduktase in mE |                   |
|------------------|--------------|-------------|-------------------------|-------------------|
|                  |              |             | mE/mg Protein           | mE/g Leber        |
| V <sub>2</sub>   | 253          | 10,65       | 4,15                    | (25) <sup>§</sup> |
| V <sub>4</sub>   | 275          | 6,25        | 2,85                    | 41,2              |
| V <sub>5</sub>   | 416          | 2,5         | 2,0                     | 35                |
| V <sub>6</sub>   | 296          | 0,25        | 2,1                     | (65) <sup>§</sup> |
| VII <sub>1</sub> | 228          | 6,5         | 4,85                    | 65                |
| VII <sub>2</sub> | 203          | 5,1         | 2,9                     | 52                |
| VII <sub>3</sub> | 227          | 5,82        | 2,9                     | 35,7              |
| VII <sub>5</sub> | 250,5        | 5,1         | 2,85                    | 44                |
| Mittelwerte:     |              | 6,14 ± 2,22 | 3,6 ± 1,067             | 45,6 ± 11,05      |

1 mE entspricht einem Substratumsatz von 1 m µM/mg.h .  
<sup>§</sup>) ( ): Die Werte in Klammern wurden nicht bestimmt, sondern aus dem Mittelwert errechnet. In der statistischen Berechnung wurden diese Werte nicht verwertet.

### 3. Die Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase in hypo- und hyperthyreoten Ratten.

Die Messung der HMG-CoA-Reduktase hatte bei Normaltieren Ergebnisse geliefert, die in einem relativ engen Schwankungsbereich lagen. Die Standardabweichung von 28 % des Mittelwertes machte es möglich, Vergleiche zwischen Normaltieren und Tieren mit veränderter Schilddrüsenfunktion durchzuführen.

Durch Gewichtskurven und Messung des PBJ (126) konnte deutlich die Wirkung von appliziertem  $^{131}\text{J}$  und subcutan injiziertem oder oral zugeführtem Schilddrüsenhormon verfolgt werden (siehe Abb.4):

- a. Nach intraperitonealer Applikation von 400-600  $\mu\text{C } ^{131}\text{J}$  pro Tier kam es innerhalb von 14 Tagen bis 3 Wochen zu einem Wachstumsstillstand, wie er auch nach operativer Thyreoidektomie beobachtet wird (66). Die Wirksamkeit der Radiojodbehandlung zeigte sich bei makroskopischen Kontrollen der Schilddrüsen und Messungen der PBJ-Werte. Die behandelten Tiere hatten eine völlig vernarbte Schilddrüse, die nach autoradiographischen Untersuchungen von Jovanovic (79) nur noch wenige kleine speicherungs-fähige Follikel enthält. Das PBJ sank auf mehr als die Hälfte des Normalwertes ab. Um eine direkte Wirkung der Strahlung im Sinne einer Steigerung der Cholesterinsynthese (25) auszuschließen, wurden die Tiere frühestens vier Wochen nach  $^{131}\text{J}$ -Applikation zum Versuch verwendet. Zu diesem Zeitpunkt waren nur noch Spuren von Gammastrahlung nachweisbar.

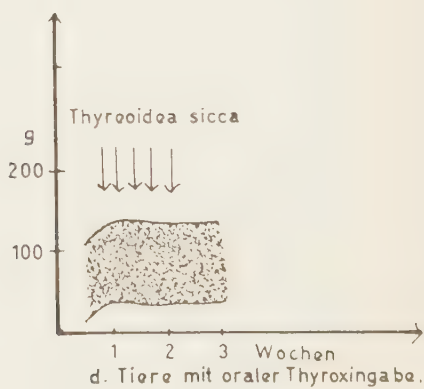
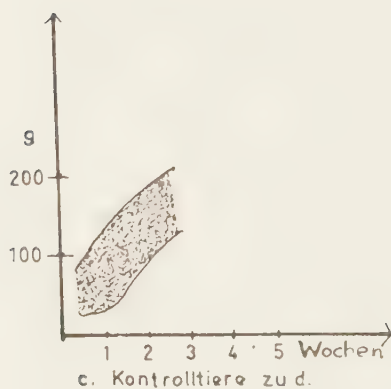
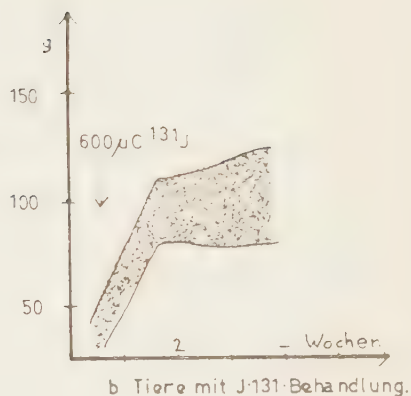
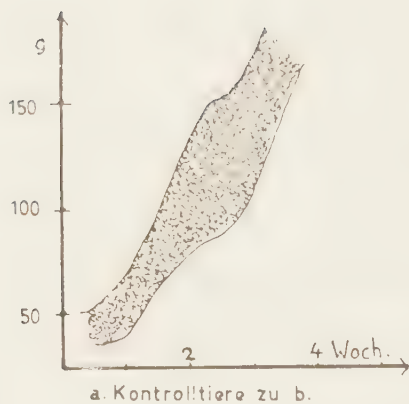


Abb. 4 Gewichtskurven von vier Rattengruppen.

b. Nach längerer oraler Zufuhr von getrockneten Schilddrüsenpräparaten (Thyreoidea sicca) oder subcutaner Gabe von kristallsuspendiertem Trijodthyronin wurde ebenfalls ein Wachstumsstillstand innerhalb weniger Tage erreicht (s. Abb. 4d). Messungen des proteingebundenen Jods ergaben hier Werte über 40  $\mu\text{g} \%$ . Es handelt sich also um durch Hypermetabolismus bedingten Wachstumsstillstand bei Thyreotoxikose.

Die Messung der HMG-CoA-Reduktase in den entsprechenden Tiergruppen ergab eine deutliche Abhängigkeit des Enzyms vom Funktionszustand der Schilddrüse: Hypothyreote Tiere lagen durchschnittlich 58 % unter dem Mittelwert der Normaltiere. In der gleichen Größenordnung lagen auch die der schilddrüsengefütterten thyreotoxischen Tiere. Tabelle E zeigt die Einzelergebnisse, in der Abbildung 5 werden die Tabellen D und E zusammengefaßt.

Vergleicht man alle Werte untereinander, so fällt nicht nur die schon erwähnte Abhängigkeit der HMG-CoA-Reduktase vom PBJ-Wert auf, sondern auch eine Beziehung zwischen Körpergewicht (bei gleichem Alter!) und Enzymaktivität. In Abbildung 6 ist die HMG-CoA-Reduktase elf gleichaltriger Ratten gegen das Körpergewicht und gegen das PBJ aufgetragen. In beiden Beziehungen wird eine lineare Abhängigkeit deutlich: Bei steigendem PBJ steigt die HMG-CoA-Reduktase an. Die gleichzeitig beobachtete Abhängigkeit vom Körpergewicht deutet auf eine komplexe Natur der Beziehung zwischen Schilddrüsenfunktion und HMG-CoA-Reduktase hin.

Tabelle E : HMG-CoA-Reduktase in Lebern hyperthyreoter und hypothyreoter Ratten.

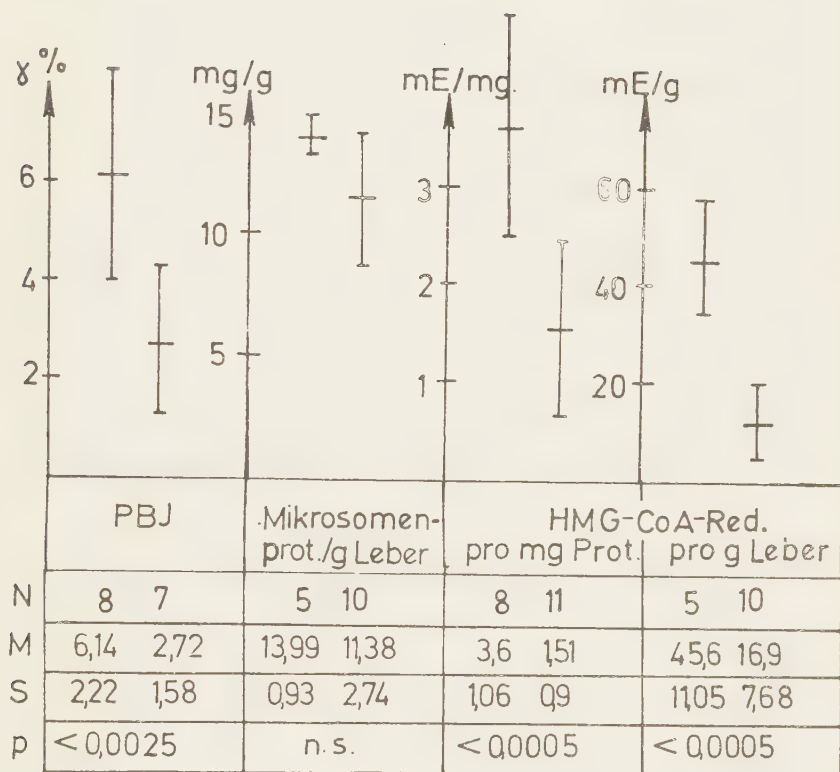
a. Thyreotoxikose.

| Tier Nr.        | Gewicht | PBJ              | HMG-CoA-Reduktase |
|-----------------|---------|------------------|-------------------|
|                 | g       | $\mu\text{g}/\%$ | mE/mg Protein     |
| IV <sub>2</sub> | 260     | 45               | 1,1               |
| IV <sub>3</sub> | 258     | 40               | 1,3               |
| IV <sub>5</sub> | 268     | 50               | 1,4               |
| IV <sub>6</sub> | 210     | 40               | 1,6               |
| Mittelwert:     |         |                  | 1,35              |

b. Hypothyreose.

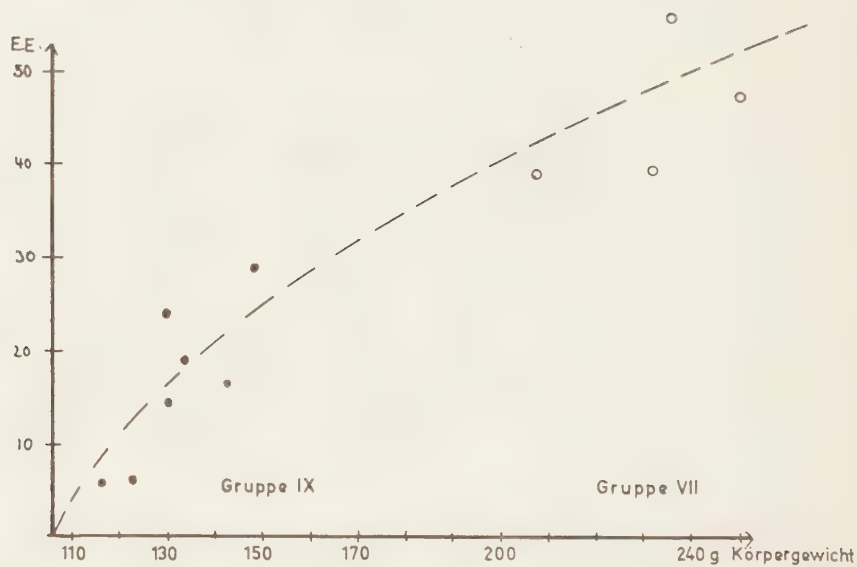
| Tier Nr.             | Gewicht | PBJ              | HMG-CoA-Reduktase |            | Laktogenprotein |
|----------------------|---------|------------------|-------------------|------------|-----------------|
|                      | g       | $\mu\text{g}/\%$ | mE/mg Pr          | mE/g Leb.  | mg Pr/g Leber   |
| VI <sub>3</sub>      | 280     |                  | 0,9               | 8,9        | 9,3             |
| VI <sub>4</sub>      | 338     |                  | 1,45              | 20,0       | 11,9            |
| VI <sub>5</sub>      | 294     | 5,5              | 2,9               |            |                 |
| VI <sub>6</sub>      | 222     | 4,65             | 0,9               |            |                 |
| IX <sub>1</sub>      | 115     | 1,7              | 0,62              | 5,5        | 0,7             |
| IX <sub>2</sub>      | 122     | 2,1              | 0,57              | 6,0        | 10,3            |
| IX <sub>3</sub>      | 129     | 1,5              | 1,49              | 14,5       | 9,8             |
| IX <sub>4</sub>      | 147     | 2,1              | 2,67              | 28,0       | 10,5            |
| IX <sub>5</sub>      | 120     | 1,5              | 2,5               | 24,5       | 3,8             |
| XI <sub>3</sub>      | 141     |                  | 1,10              | 16,5       | 14,2            |
| XI <sub>4</sub>      | 132     |                  | 1,01              | 18,0       | 17,8            |
| Mittelwerte $\pm$ s: |         | 2,22             | 1,51              | 16,9       | 11,38           |
|                      |         | $\pm 1,58$       | $\pm 0,9$         | $\pm 7,68$ | $\pm 2,74$      |

Abb.5

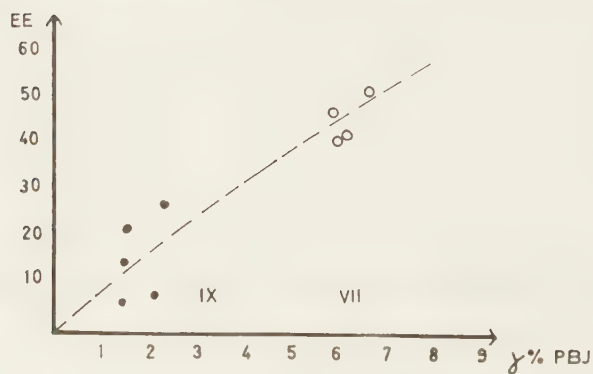


Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (S) der Messungen an normalen (links) und hypothyreoten (rechts) Rattenlebermikrosomen.

Abb. 6



a. Abhängigkeit der HMG-CoA-Reductase vom Körpergewicht bei gleichem Alter.



b. Abhängigkeit der HMG-CoA-Reductase vom PBJ.

#### 4. Das Verhalten der HMG-CoA-Reduktase in der perfundierten Rattenleber.

Nach Gries, Matschinsky und Wieland (64) läßt sich bei Perfusion der Lebern (102) hypothyreoter Ratten durch Zufügen von Trijodthyronin zum Durchströmungsmedium ein Wiederanstieg der HMG-CoA-Reduktase erreichen, der bald nach Zugabe des Hormons beginnt und innerhalb der sechs-stündigen Versuchsdauer zur Wiederherstellung des Normalwertes führt. Diese Versuche ließen eine direkte Wirkung des Schilddrüsenhormons auf die Leber im Sinne einer Enzyminduktion vermuten (63). Die direkte Messung der HMG-CoA-Reduktase mit  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA gab die Möglichkeit, diese Experimente zu überprüfen.

Zunächst wurden in gleicher Versuchsanordnung zwei normale Rattenlebern durchströmt. Eines der Perfusions-systeme erhielt nach Abnahme einer Leberprobe zur Feststellung des Ausgangswertes  $50 \mu\text{g}$  Trijodthyronin. Das PBJ stieg daraufhin auf  $35 \mu\text{g} \%$  an, während es im Perfusionsmedium des Kontrollversuches niedrig blieb. Die nach zwei und vier Stunden abgenommenen Leberläppchen wurden gleichzeitig zusammen mit den Ausgangswerten verarbeitet und ihr HMG-CoA-Reduktasegehalt gemessen. Es zeigte sich, im Gegensatz zu den früheren Ergebnissen (63), ein ständiger Abfall der HMG-CoA-Reduktase während der Perfusionszeit von fünf Stunden. Beim unbehandelten Tier ging dieser Abfall auf unter 10 % des Ausgangswertes, beim  $\text{T}_3$ -behandelten Tier auf etwa 50 %. Die gleichzeitig mitbestimmte Pyruvatcarboxylase (141) sowie die früher mit-

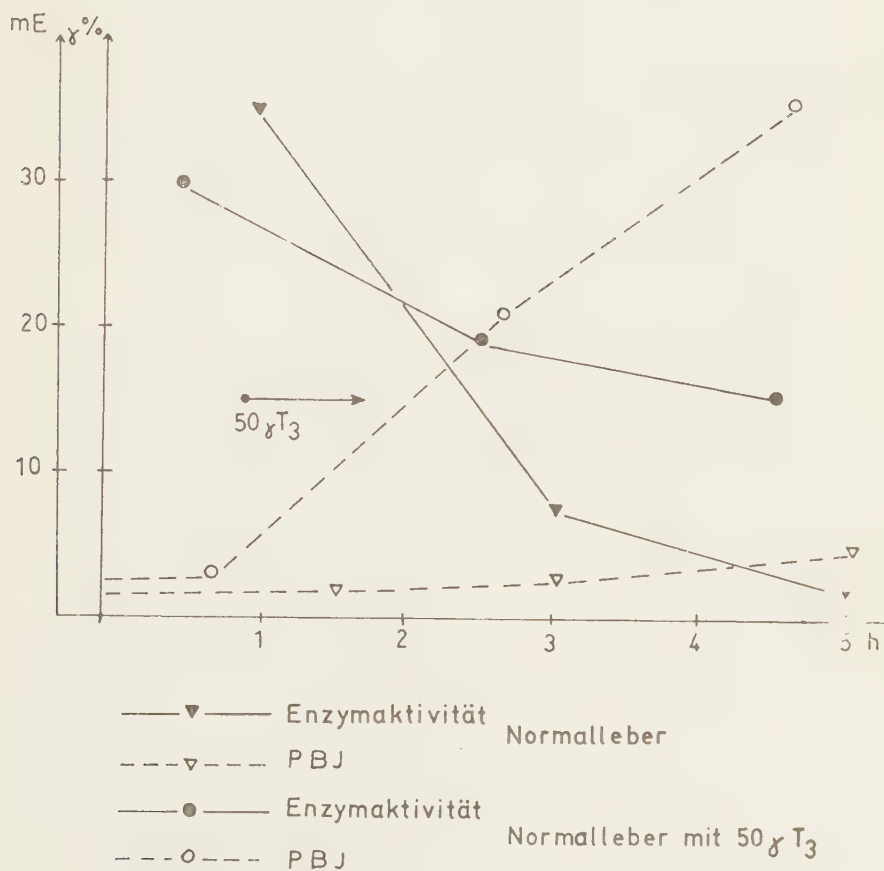
bestimmte Acetatthiokinase (64) blieben während der gesamten Versuchsdauer unverändert.

Die Perfusion der Lebern zweier hypothyreoter Ratten zeigte die gleiche Tendenz: Bei niedrigeren Ausgangsaktivitäten fiel die HMG-CoA-Reduktase mit und ohne Zugabe von Trijodthyronin auf Werte unter 50 % der Ausgangsaktivität ab. Inzwischen von I. Nolte (111) durchgeführte weitere Versuche mit einer Stoßdosis von  $50 \mu\text{g T}_3$  bestätigten diese Ergebnisse: Nach anfänglichem Gleichbleiben oder sogar leichtem Ansteigen der Aktivität kam es zu dem immer gleichen Abfall. Die PBJ-Kontrollen des Perfusionsmediums ergaben in allen  $\text{T}_3$ -Perfusionen Werte über 20  $\mu\text{g} \%$ .

Eine Induktion des Enzyms ließ sich also wider Erwarten in dem durch die Perfusionstechnik zugänglichen Zeitraum von fünf Stunden nicht erreichen. Es kam im Gegenteil zu einem erheblichen Abfall der Enzymaktivität aus noch zu diskutierenden Ursachen, die möglicherweise eine Aktivitätszunahme des Enzyms überlagerten. Jedoch deutet der sowohl in den  $\text{T}_3$ - wie auch in den Kontrollversuchen steile Abfall darauf hin, daß eine Aktivierung im Sinne der Induktion nicht stattfindet. Um die Wirkung des Hormons bei längerer Einwirkung auf hypothyreote Lebern zu studieren, musste eine andere Versuchstechnik gefunden werden.

Abbildung 7 zeigt das Verhalten der Enzymaktivität und des PBJ in zwei typischen Leberperfusionen.

Abb. 7: Verhalten der HMG-CoA-Reduktase in der Leberperfusion mit und ohne Trijodthyronin.





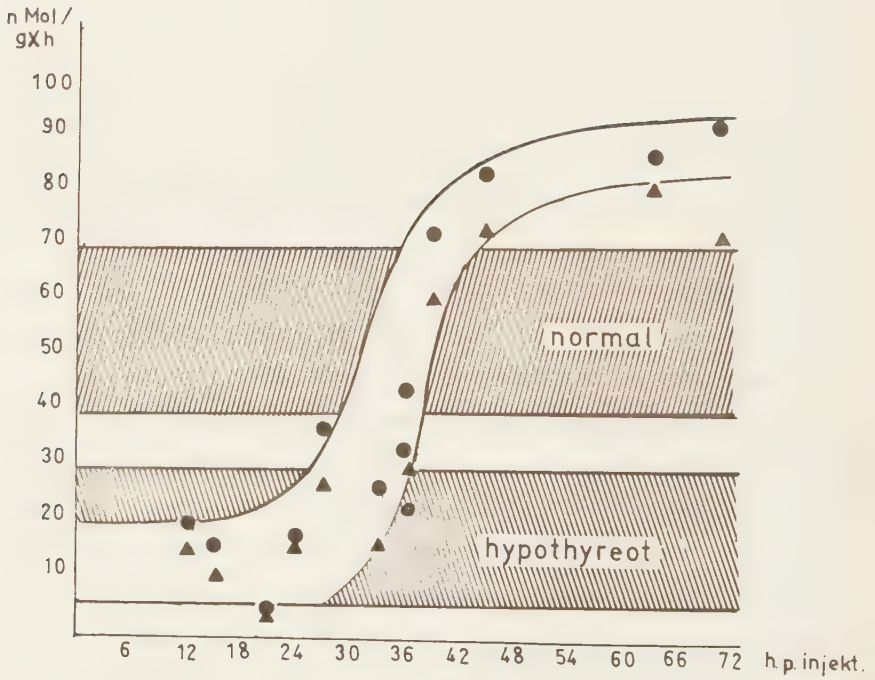
## 5. Bestimmung der HMG-CoA-Reduktase hypothyreoter Ratten nach einmaliger Injektion von $50 \mu\text{g T}_3$ .

Mit einer von Tata und Mitarbeitern (148,149) entwickelten Technik ist es möglich, die Zeit von der Applikation eines Hormons bis zum Eintreffen der Wirkung, in diesem Falle der Enzyminduktion, zu messen. Dabei wird ein Kollektiv von Hormonmangeltieren zu verschiedenen Zeiten vor der Enzymbestimmung mit dem Hormon gespritzt, so daß zum Zeitpunkt des Todes der Tiere die Lebern verschieden lange unter Hormoneinfluss standen.

Zwölf hypothyreote Tiere erhielten zwischen 12 und 70 Stunden vor dem Tode je  $50 \mu\text{g T}_3$  subcutan injiziert und wurden schließlich gemeinsam getötet. Doppelmessungen der HMG-CoA-Reduktase erbrachten für jede Leber stets nahe beieinander liegende Werte. Sie sind in Abbildung 8 gegen die Zeit aufgetragen, die zwischen Hormoninjektion und Tod des Tieres vergangen war.

Die 95 % der Messwerte umrahmende Schleife zeigt einen s-förmigen Verlauf mit einem Wendepunkt bei etwa 32-35 Stunden. Aus den mitausgeführten normalen und hypothyreoten Bereichen ist zu ersehen, daß das Enzym erst zu diesem Zeitpunkt den Bereich hypothyreoter Tiere verläßt und innerhalb weniger Stunden sehr steil auf Werte oberhalb des Normbereichs ansteigt. Nach etwa 48 Stunden erreicht die Aktivität ein über der Norm liegendes Plateau.

Abb. 8:



Verhalten der HMG-Co A- Reductase der Rattenleber nach  
subcutaner Injektion von 50 Gamma Trijodthyronin

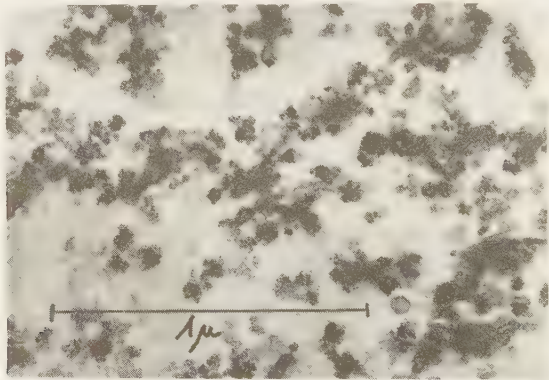
## 6. Untersuchungen über die Lokalisation der HMG-CoA-Reduktase in den Leberzellen.

Nach der Entdeckung des HMG-CoA reduzierenden Enzyms in Hefe (41,81) und Leber (28) wurde die Rolle dieses Enzyms beim Zustandekommen der Ketose und im Hungerzustand diskutiert (163). Da sich die Reaktionen, welche zur Bildung der Ketonkörper führen, hauptsächlich in den Mitochondrien abspielen, die Bildung der Mevalonsäure jedoch an die mikrosomale Zellfraktion gebunden ist ( 24,28,117 ), ergab sich die Frage nach der genauen Lokalisation dieses Enzyms in der Zelle.

Nach den elektronenoptisch-biochemischen Untersuchungen von Palade und Siekevitz (113) stellen Lebermikrosomen Teile des endoplasmatischen Retikulums dar. Sie bestehen zum größten Teil aus Membranen mit angehefteten RNS-reichen Ribosomen. Daneben enthält die Mikrosomenfraktion jedoch noch Membranen ohne Ribosomen, sogenannte 'smooth' Membranen (34,115), welche unter anderem Träger eines leberspezifischen Enzymsystems sind, das an der Synthese des Glykogens beteiligt ist (92). Da eine elektronenoptische Methode zum histochemischen Nachweis der HMG-CoA-Reduktase noch nicht vorliegt, mußte auf feinere Fraktionierungsmethoden zurückgegriffen werden. Dazu war eine weitere Auftrennung des 100 000 g-Niederschlags (siehe S.83 ) nötig. Eine morphologische Kontrolle der Arbeitsgänge mit Hilfe des Elektronenmikroskopes erwies sich dabei als äußerst nützlich.

Der mitochondrienfreie 100 000 g - Niederschlag läßt schon makroskopisch drei Schichten erkennen : Über einer die Rundung des Zentrifugenröhrchens füllenden, rosa-transparenten Schicht liegt eine zweite von festerer Konsistenz und dunkelroter Farbe. Zwischen diesem festen Niederschlag und dem klaren Überstand findet man häufig einen membranartigen grauen Schleier. Diesen drei Schichten entsprechen elektronenoptisch klar unterscheidbare Bilder. Die Fotos I-III zeigen die drei verschiedenen Schichten. §

Foto Nr. I :

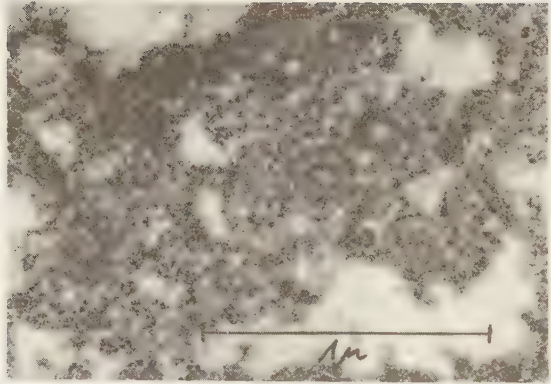


Unterste Schicht: Optisch dichte Granula (  $\varnothing$  50-65 m $\mu$  ), die aus kleineren Einheiten (  $\varnothing$  3 m $\mu$  ) aufgebaut sind. Vereinzelt sind glatte Membranen an die Partikel angelagert. Die Granula stellen das Glykogen dar(40).

---

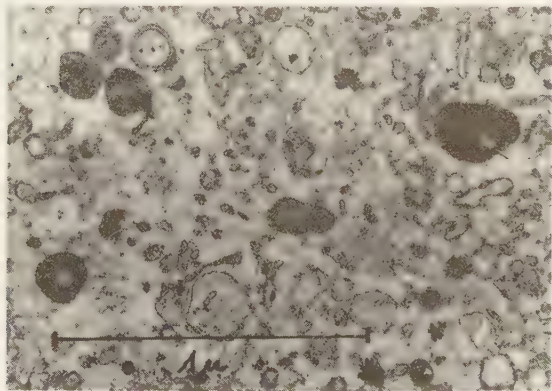
§ An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. F. Miller, elektronenmikroskopische Abteilung des pathologischen Instituts der Universität München, noch einmal herzlich für die großzügige Unterstützung meiner Arbeit danken, besonders für die Praeparation und die Hilfe bei der Beurteilung der Fotos.

Foto Nr.II :



Mittlere Schicht: Diese makroskopisch dunkelrote Schicht besteht vorwiegend aus dichten, 15-20m/ $\mu$  großen, teilweise an Membranen aufgereihten Granula. Die Membranen sind Bruchstücke des 'rauen' endoplasmatischen Reticulums, die an ihnen haftenden oder frei liegenden Granula Ribosomen (34,113).

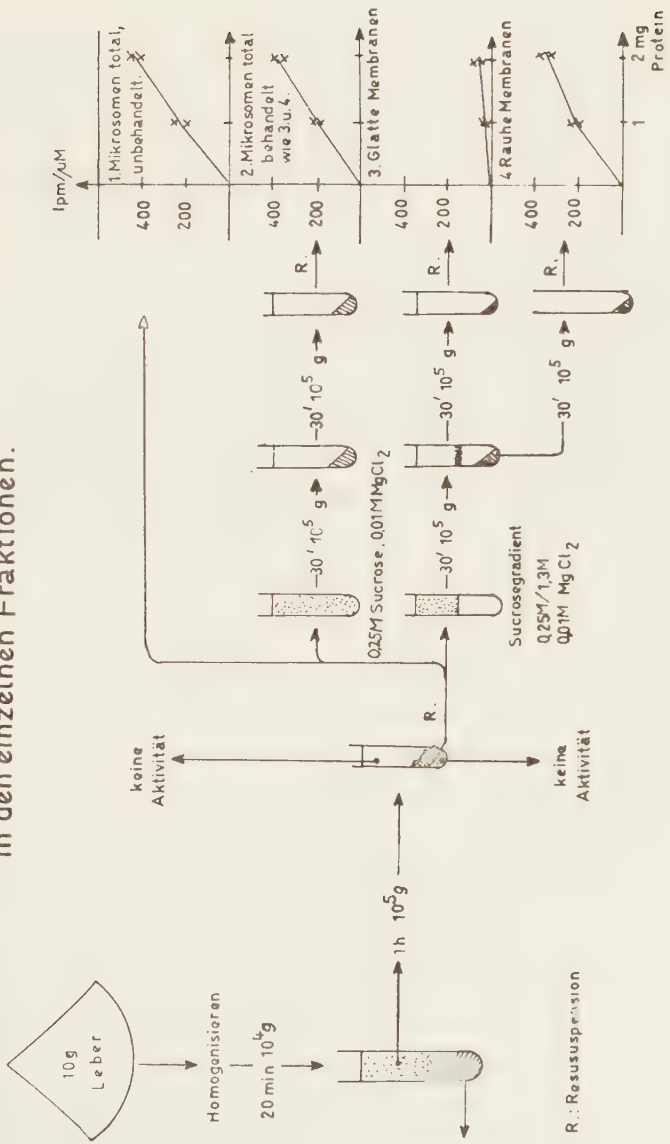
Foto Nr. III:



Oberste Schicht: Das inhomogene Material enthält überwiegend glatte Membranen neben vereinzelten Ribosomen und Glykogenpartikeln. Die Membranen liegen teilweise in Form von Schläuchen und Vakuolen; man erkennt dichte vakuolisierte Körper (Lysosomen) und Bruchstücke des Golgiapparates (115).

Versuche, die verschiedenen Schichten mechanisch voneinander zu trennen, erbrachten zwar eine gute Abtrennung der Glykogenschicht, die nur geringe Spuren von Reduktaseaktivität enthielt, jedoch ließen sich die beiden oberen Teile des Niederschlages nicht sauber genug isolieren. Daher wurden weitere Versuche im Sucrosegradienten durchgeführt. Die in 0,25 M Sucrose suspendierten Mikrosomen wurden über eine 1,3 M Sucroselösung geschichtet. Bei der anschließend durchgeführten Zentrifugierung sollten die schweren, mit Ribosomen behafteten Membranen in das dichte Medium absinken, die glatten Membranen aber in der Zwischenschicht verbleiben. Versuche, die Trennung nach einer Vorschrift von Fouts (53) durchzuführen, brachten jedoch kein klares Ergebnis. Trotz zwölfstündigen Zentrifugierens bei 100 000 g blieb immer eine leichte Trübung zwischen Sediment und Zwischenschicht. Das Bild änderte sich nach Zugabe von Magnesiumionen zur Sucroselösung (34,35). Im gleichen Sucrosegradienten kam es bei Anwesenheit von 0,01 M  $MgCl_2$  schon nach einer halben Stunde zu einer klaren Trennung in zwei Schichten. Diese konnten durch Pipettieren leicht voneinander getrennt werden. Nach Resuspension und Einstellen dieser Suspensionen auf den gleichen Proteingehalt wurden diese Subfraktionen in den Test eingesetzt. Abbildung 9 stellt die einzelnen Arbeitsgänge der Fraktionierung schematisch dar ( technische Einzelheiten siehe im experimentellen Teil ). Am Ende sind die Ergebnisse der Messungen in den Subfraktionen und den Kontrollsuspensionen aufgezeichnet.

Abb. 9:  
Fraktionierung der Lebermikrosomen mit Messung der HMG-Co A -Reductase  
in den einzelnen Fraktionen.



Man sieht daraus, daß

1. die Aktivität des Enzyms durch wiederholtes Zentrifugieren und Resuspendieren um etwa 20 % im Gesamtmikrosomenpräparat abnimmt,
2. die Verteilung der Enzymaktivität in den Subfraktionen klar zugunsten der die rauhen Membranen enthaltenden Fraktion ausfällt.

Die HMG-CoA-Reduktase ist also im rauhen Teil des endoplasmatischen Reticulums der Zelle enthalten. Durch Abspaltung der Ribosomen mit Hilfe von Desoxycholat läßt sich weiterhin sagen (129), daß die Reduktase in den Membranen selbst, nicht in den Ribosomen fixiert ist.

### III. Diskussion

#### 1. HMG-CoA-Reduktase, Cholesterinsynthese und Mevalonsäurespiegel der Rattenleber.

Der erste für die Cholesterinsynthese der Leber spezifische Schritt ist die Bildung der Mevalonsäure aus HMG-CoA (41,47,81). Einmal gebildete Mevalonsäure wird fast ausschließlich in Squalen und die Steroide eingebaut (44,71,150). Daher wurde schon bald nach der Entdeckung der Mevalonsäure (168) versucht, dieses Zwischenprodukt in Homogenaten und biologischen Flüssigkeiten nachzuweisen (23,91). Die dabei gewonnenen sich widersprechenden Ergebnisse über den Mevalonsäuregehalt der Rattenleber ließen sich durch die im ersten Teil der Ergebnisse aufgeführten Experimente auf methodische Schwierigkeiten zurückführen. Die im optischen Test (73) verwendete Mevalonsäurekinase (72) erwies sich als noch zu unspezifisch, so daß sie irreführende Ergebnisse lieferte. Nach weiterer Reinigung des Hefeenzym auf DEAE-Zellulose ließ sich in der vorliegenden Arbeit zeigen, daß der Mevalonsäurespiegel der Leber so gering ist, daß er mit optisch enzymatischen Methoden nicht mehr erfasst werden kann. Zu dem gleichen Ergebnis kam N. Bucher (23) mit einem Isotopenverdünnungstest. Sie fand in der Rattenleber, bei Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden, kaum messbare Mevalonsäurewerte.

Die Gegenüberstellung der beiden Lebereenzyme HMG-CoA-Reduktase und Mevalonatkinase zeigt, daß die Kinase in höherer Aktivität vorliegt als die Reduktase (27,28,89). Man darf daraus folgern, daß der Mevalonsäureverbrauch rascher erfolgt als die Bildung der Mevalonsäure. Schon aus diesem Grunde ist es wenig wahrscheinlich, daß sich ein so großer Spiegel an Mevalonsäure in der Leber einstellen kann, wie er von anderen Autoren angegeben wurde (91,163).

Eine weitere Bestätigung dieser enzymkinetischen Überlegung lieferte das *in vivo* Experiment: Nach 40-minütiger Infusion von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in die Pfortader der Ratte wurde in der durch Celitechromatographie isolierten Mevalonsäurefraktion (48) keine Radioaktivität gefunden, obwohl bei gleicher und ähnlicher Versuchsanordnung  $^{14}\text{C}$ -Acetat in die Cholesterinfraktion eingebaut wird (77, 162,169). Nach Kattermann u.a. (80) ist die Radioaktivität des infundierten Acetats in der Serumcholesterinfraktion schon nach 30 Minuten nachweisbar und erreicht bereits nach zwei Stunden ihr Maximum. Auch die Tatsache, daß bei Beendigung des Versuches nur noch der geringste Teil der Radioaktivität in Form von Acetat vorlag (siehe Abb.2), zeigt, daß das negative Ergebnis nicht als Folge einer mangelhaften Verwertung des infundierten Acetats aufgefaßt werden kann. Darüber hinaus wies Felts (46) im gleichen Experiment nach, daß die Aktivierung des Acetats zu Acetyl-CoA und seine Ein-

schleusung in den Intermediärstoffwechsel erfolgt und keinen limitierenden Faktor darstellen kann. Bei den nicht weiter identifizierten radioaktiv markierten Stoffwechselprodukten der Abbildung 2 (Seite 14) dürfte es sich wohl überwiegend um Komponenten des Zitronensäurezyklus (143) und Aminosäuren handeln, deren radioaktive Markierung nach Untersuchungen von Holdsworth und Mitarbeitern (77) bei Schafen im Anschluss an Infusion von  $^{14}\text{C}$ -Acetat sehr rasch erfolgt.

Im Zusammenhang mit dem negativen Ergebnis der Einbauversuche sind auch Beobachtungen von Knauss u.a. (83) interessant, die in vitro Mevalonsäure als Zwischenprodukt der Cholesterinsynthese nachzuweisen versuchten. Ihre Mevalonsäurehaltige Fraktion enthielt keine Radioaktivität, bis sie durch Einsetzen eines "Fangteiches" von  $10\text{ }\mu\text{M}$  kalter Mevalonsäure den offenbar außerordentlich raschen Umsatz der  $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure soweit verlangsamten konnten, daß sie messbare Mengen  $^{14}\text{C}$ -Mevalonat erhielten. Vergleichende Einbauversuche von  $^{14}\text{C}$ -Acetat und  $^{14}\text{C}$ -Mevalonat in Cholesterin und Squalen zeigten, wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, daß Versuchsbedingungen, welche die Geschwindigkeit des Acetateinbaues in Cholesterin verändern, sich nicht oder nur in geringem Maße auf den Einbau von Mevalonat in Cholesterin auswirken. Beobachtungen dieser Art wurden von Bucher u.a. bei Hunger und Röntgenbestrahlung (25,26), von Siperstein u.a. bei Cholesterinfütterung (8,131) und

von Fletscher und Myant (49) nach Veränderung der Schilddrüsenfunktion angestellt. Gemeinsam geben alle Autoren ihren Versuchsergebnissen die gleiche Deutung: Die Kontrolle durch die oben genannten Faktoren in der Kette der Cholesterinsynthese muss vor der Bildung der Mevalonsäure liegen. Siperstein (129), Wieland (163) und Bucher (28) konnten nachweisen, daß die Rate der HMG-CoA-Bildung nicht verändert war, sondern, verglichen mit der Cholesterinsynthese, sich eher umgekehrt verhielt (130). Sie hatten dadurch die HMG-CoA-Reduktase als das die Cholesterinsynthese limitierende Enzym erkannt. Das Reaktionsprodukt einer Synthesekette limitierenden Enzyms kann sich jedoch nicht in messbaren Mengen anhäufen, da die folgenden Enzyme stets ungesättigt vorliegen und jedes neu entstehende Substrat gleich an sich binden (118). Aus diesem Grunde kann selbst bei maximaler Cholesterinsynthese, so lange die HMG-CoA-Reduktase das limitierende Enzym ist, nur der Umsatz (turnover), nicht aber der Spiegel der Mevalonsäure erhöht sein.

## 2. Beziehungen zwischen HMG-CoA-Reduktase und Schilddrüsenfunktion.

Nachdem die HMG-CoA-Reduktase als das die Cholesterinsynthese limitierende Enzym erkannt worden war, wurde seine Aktivität von Bucher u.a. (26), Löffler (91) und Gries u.a. (63) bestimmt. Die Ergebnisse, welche mit

verschiedenen Methoden erhalten wurden, differieren erheblich voneinander. Die in der vorliegenden Arbeit benutzte, von Regen (117) angegebene und ausgearbeitete Methode machte es möglich, den optisch enzymatischen Test zu umgehen und so eventuell störende Nebenreaktionen auszuschalten.

Die bei Normaltieren gefundenen HMG-CoA-Reduktaseaktivitäten von 38 - 65 mE pro Gramm Leberfrischgewicht liegen weit unter den von Löffler angegebenen Werten (163), der 60 mE pro Milligramm seines rohen Leberhomogenats fand. Da etwa 70 mg Protein des damals verwendeten Homogenats einem Gramm Leber entsprechen, verhalten sich die Ergebnisse wie 1:70 bis 1:100. Für diese Differenzen dürften hauptsächlich methodische Faktoren verantwortlich zu machen sein:

1. Beim Isotopentest vergehen vom Tod des Tieres bis zur Enzymbestimmung jeweils etwa acht Stunden, bedingt durch die Aufbereitungszeit der Mikrosomen und die Herstellung der zum Test notwendigen frischen Lösungen. In dieser Zeit nimmt der Acetateinbau in Cholesterin laufend ab, wie Hamprecht (68) an Leberschnitten nachwies. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Test liegen demnach die Aktivitäten, verglichen mit dem in-vivo-Zustand, sicher zu niedrig.
2. Im optischen Test mit *Clostridium-cluyveri*-extrakt wurde ein relativ hoher Leerwert (mehr als 20 % des Messwertes) erhalten, der auf unspezifische Begleitreaktionen schließen läßt. Hierdurch konnten zu hohe Werte vorgetäuscht werden.

3. Die HMG-CoA-Reduktase reagiert gegen physikalisch-chemische Milieuänderungen sehr empfindlich (116), so daß schon geringe Veränderungen der Zusammensetzung des Tests, die zu pH-Verschiebungen, Änderungen der Salz- oder Proteinkonzentration usw. führen, andere Ergebnisse erwarten lassen.

Diese und weitere Beobachtungen lassen es unfruchtbar erscheinen, die absoluten Werte der HMG-CoA-Reduktaseaktivität mit der Cholesterinsynthese aus Acetat in Leberschnitten oder mit den Messungen anderer Laboratorien zu vergleichen. Es ist anzunehmen, daß die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in der lebenden Zelle höher liegt, als sie in vitro gemessen wird, da das Enzym

1. in der Zelle strukturgebunden vorliegt (129), und diese Struktur bei der Aufarbeitung der Mikrosomen zerstört wird,
  2. die Messung des Enzyms aus technischen Gründen erst 8 - 12 Stunden post mortem durchgeführt werden konnte.
- Die hier vorgelegten Ergebnisse sind also nur untereinander vergleichbar und sollen dazu dienen, Veränderungen bei gleichen Versuchsbedingungen aufzuzeigen.

Unter der Voraussetzung, daß die Veränderung der Schilddrüsenfunktion keinen grundsätzlichen Einfluss auf das Verhalten der Reduktase bei der Präparation hat, liegt eine statistisch gesicherte Abhängigkeit zwischen Cholesterinsynthese und proteingebundenem Jod vor. Die Ausschaltung der Schilddrüse mit  $^{131}\text{J}$  bewirkte eine Senkung

der HMG-CoA-Reduktaseaktivität auf 40 % des Normalwertes. Einen Abfall des Enzyms nach operativer Thyreodektomie hatte schon Gries (63) beobachtet. Bei Einsatz des 22 000 g Überstandes eines Periston-Leberhomogenats in den Test hatte er ein fast völliges Verschwinden der HMG-CoA-Reduktase bei den hypothyreoten Tieren gefunden. Durch parenterale Zufuhr von Trijodthyronin ließ sich die Enzymaktivität steigern (64). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte auch in dieser Arbeit bei Messung der Reduktase mit  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA eine gegenüber der Norm erniedrigte Enzymaktivität bei Hypothyreose festgestellt werden, doch lassen sich auch hier wegen der methodischen Verschiedenheiten keine quantitativen Vergleiche mit den früheren Arbeiten anstellen. Jedenfalls dürfte mit diesen Experimenten die Vermutung Fletschers(49), daß die verminderte Cholesterinsynthese bei Hypothyreose (63,106) mit einer starken Abnahme der HMG-CoA-Reduktase einhergeht, eindeutig erwiesen sein.

Die bei Hyperthyreose beobachtete Steigerung der Enzymaktivität (64) konnte nicht bestätigt werden, doch lassen der Gewichtsverlust und die extrem hoch liegenden PBJ-werte der Versuchstiere vermuten, daß es sich bei der geringen Abnahme der Enzymaktivität um einen toxischen Effekt handelt, der weit außerhalb des Bereiches der in 'Abbildung 6b belegten Abhängigkeit zwischen PBJ und HMG-CoA-Reduktase liegt. Die starke Streuung der Werte auf dieser Kurve ist wohl in erster Linie auf die Ungenauig-

keit der PBJ-Methode zur Erfassung der Schilddrüsenaktivität zurückzuführen. Seren hypothyreoter Ratten ergeben oft an der unteren Grenze der Norm liegende PBJ-Werte; bei Thyreotoxikosen über 20  $\mu$ g % lassen sich quantitative Ergebnisse nicht mehr erzielen (126). Dennoch ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom PBJ-Spiegel und damit vom Funktionszustand der Schilddrüse deutlich sichtbar.

Dagegen brachten die Versuche, die bei Hypothyreose abgesunkene HMG-CoA-Reduktaseaktivität in der Leberperfusion durch Zufuhr von Trijodthyronin wieder anzuheben, nicht das von Gries et al. (64) beschriebene Resultat. Obwohl das PBJ auf 35  $\mu$ g % anstieg und der Zustand der Lebern einwandfrei war, sank die HMG-CoA-Reduktase während der vierstündigen Versuchsdauer schon im Kontrollversuch mit Normaltieren kontinuierlich ab. Weitere inzwischen durchgeführte Perfusionsversuche mit hypothyreoten Ratten (111) zeigten einen leichten Enzymanstieg während der ersten beiden Stunden der Perfusion nach Zugabe des Trijodthyronins; danach kam es jedoch ebenfalls zu einem Abfall der Aktivität unter den Ausgangswert. Ob es sich bei dieser Beobachtung um einen vorübergehenden Induktionseffekt handelt, muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben.

Für die Beurteilung der Perfusionsversuche erscheint es von Bedeutung, daß der Aktivitätssturz speziell die HMG-CoA-Reduktase betraf. Andere Enzyme, wie die gleichzeitig bestimmte Pyruvatcarboxylase (141) und die Acetatthiokinase (63) blieben im gleichen Zeitraum unverändert.

Möglicherweise läßt sich der starke Rückgang der Aktivität mit den Beobachtungen Buchers et al.(26), Wielands et al. (163) und Regens et al.(117) über den Abfall der HMG-CoA-Reduktase bei Hunger erklären. Zweifellos wäre das Perfusionssystem ein geeignetes Modell, um den Mechanismus dieser Beziehung aufzuklären.

Der Widerspruch zu den früheren Arbeiten, die einen starken Anstieg der HMG-CoA-Reduktase nach  $T_3$ -Zufuhr ergeben hatten (63,64), könnte wiederum durch die Verschiedenheiten der Testmethoden bedingt sein. Wie schon mehrfach erwähnt, schließt die damals zum Nachweis der entstandenen Mevalonsäure verwendete Mevalonatkinase (73,91) unspezifische Einflüsse, die zu falsch hohen Ergebnissen führen, nicht aus.

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt (147-149), daß durch Trijodthyronin eine Reihe von Leberenzymen induziert wird. Nach den negativen Ergebnissen der Leberdurchströmungsversuche wurde deshalb geprüft, ob sich vielleicht am Ganztier eine Induktion der HMG-CoA-Reduktase durch Schilddrüsenhormone nachweisen läßt. Die von Tata (148) angegebene Methode der einmaligen Injektion von Trijodthyronin in hypothyreote Ratten erwies sich als sehr geeignet und brachte die Erklärung für den negativen Ausgang der Perfusionsversuche. Tatsächlich fand sich in diesen Versuchen eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität, jedoch trat der Effekt erst 25 Stunden und länger nach subcutaner Injektion von  $50 \mu\text{g } T_3$  in Erscheinung. Da die Perfusion

der isolierten Leber jedoch höchstens sechs Stunden durchführbar ist, war eine Steigerung der HMG-CoA-Reduktase in diesem Zeitraum nicht zu erwarten. Leider genügte die Anzahl der Versuchstiere nicht, um den Zeitpunkt für das Eintreffen der  $T_3$ -Wirkung exakt festzulegen, da durch individuelle Streuung die Messwerte mehr oder weniger von der hypothetisch zu fordernden Kurve abweichen. Doch zeigt die über 90 % der Messwerte umfassende S-förmige Schleife deutlich den Hauptanstieg des Enzyms zwischen der 30. und 40. Stunde nach Zufuhr des Hormons. Für ein anderes mikrosomales Enzym, die NADPH-Cytochrom-C-Reduktase, wies Tata einen Anstieg zwischen der 30. und 60. Stunde nach (147,149). Aus dem Verlauf der Kurve ist ein Kausalzusammenhang zwischen Hormonspiegel und Enzymaktivität zwar klar zu erkennen, doch lassen sich aus der verhältnismäßig großen Zeitspanne zwischen Hormonzufuhr und Eintreffen der Wirkung leider keine Rückschlüsse auf den Mechanismus der Aktivitätssteigerung ableiten. Die gefundene Abhängigkeit zwischen Körpergewicht und Enzymaktivität (Abb. 6a, Seite 26) deutet auf einen komplizierteren Mechanismus hin und läßt die Steigerung der Reduktase als Teilphänomen im Rahmen einer allgemeinen anabolen Wirkung der Schilddrüsenhormone deuten.

3. Diskussion der Ergebnisse im Rahmen des heutigen Wissens über die Thyroxinwirkung und den Cholesterinstoffwechsel.

Vergleicht man den Proteingehalt der Lebermikrosomen hypothyreoter und euthyreoter Ratten, so fällt auf, daß er bei den letzteren fast durchwegs höher liegt. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Erhöhung der Enzymaktivität durch Synthese neuer Enzymmoleküle erreicht wird. Tatsächlich konnten Sokoloff und Kaufmann (105,133) nachweisen, daß nach Thyroxingabe der Einbau von Aminosäuren in das Protein der Leberzelle, aber auch ihrer Untereinheiten, wie Mitochondrien und Mikrosomen, gesteigert ist. Zwar zwingt eine Beobachtung Michels' (105) dazu, die Proteinsynthesesteigerung als eine allgemeine Folge der Thyroxinzufuhr zu betrachten, da sie auch in anderen Organen, wie Niere und Herz stattfindet, doch deutet die hier beobachtete Tatsache, daß neben der Aktivitätssteigerung pro Gramm Frischleber auch die spezifische Aktivität des Enzyms (mE/mg Mikrosomenprotein) in den Mikrosomen ansteigt (vergl. Tabelle D und E, b Seite 20 und 24), darauf hin, daß die Wirkung des Thyroxins nicht in einer generellen Stimulierung der Proteinsynthese besteht, sondern sich diese Wirkung auf spezielle Proteine erstreckt. Dabei kommt wohl neben den mikrosomalen Enzymen der Synthese der Serumproteine die größte Bedeutung zu (58,107).

Da die Thyroxinwirkung auf die Proteinsynthese jedoch nur in Geweben zu beobachten ist, die auf Thyroxin hin einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch zeigen (105), ist oft diskutiert worden (100,146), ob nicht die Wirkung des Hormons auf Enzymaktivitäten sekundär, d.h. Folge der Steigerung des Energiestoffwechsels sein könnte. Dagegen konnten in den letzten Jahren gute experimentelle Ergebnisse beigebracht werden, daß ein kausalzusammenhang eher in umgekehrter Weise besteht, d.h., daß der durch Thyroxin bedingte Hypermetabolismus Folge der gesteigerten Synthese von Enzymen darstellt:

1. Boyd (19) und Barker (4) konnten nachweisen, daß Hormondosen, die einen deutlichen Effekt auf den Cholesterinstoffwechsel hatten, den Grundumsatz noch nicht beeinflussten.
2. Tata fand (55,149), daß die Proteinsynthese einsetzt, bevor sich Änderungen mitochondrialer Enzyme, die am Energiestoffwechsel beteiligt sind, zeigen. Schon 25 Stunden nach subcutaner Injektion von  $T_3$  begann eine gesteigerte Proteinsynthese, eine Steigerung des Grundumsatzes trat erst nach 40-70 Stunden ein (146,148).
3. Mehrere Autoren konnten die hypermetabolisierende Wirkung des Thyroxins durch Gabe von Proteinsyntheseblockern wie Puromycin und Actinomycin D hemmen (144,159).

Die letzten Ergebnisse verlagern den Ort der Thyroxinwirkung von der Proteinsynthese auf die Vorgänge, die mit der Übertragung der genetischen Information einhergehen. (145,160)

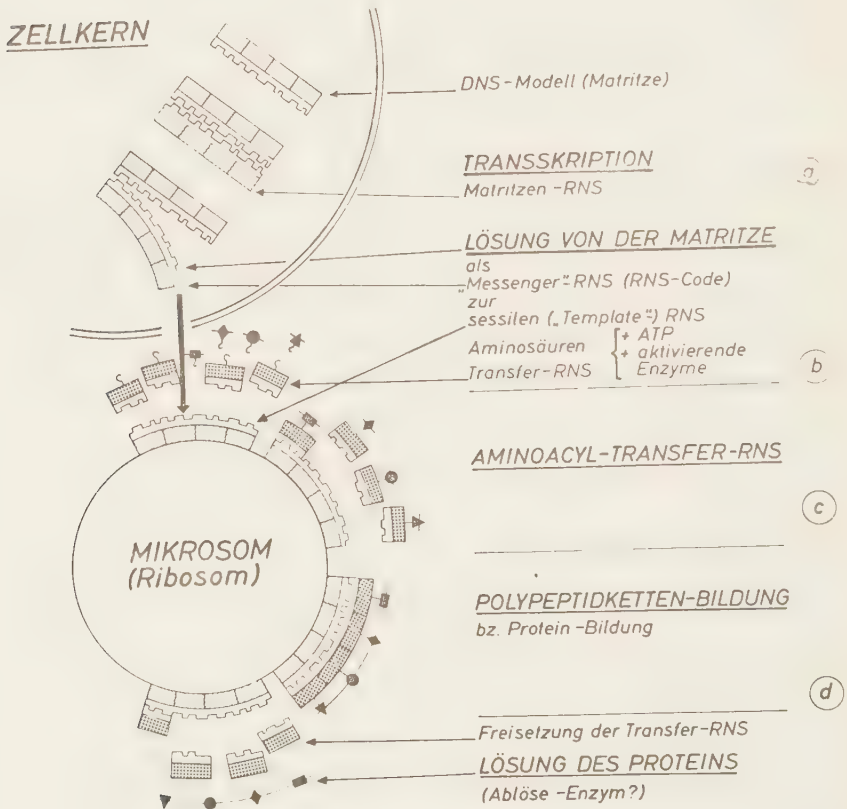
Folgt man einer Darstellung (Abb. 10, Seite 50), welche die an der Proteinsynthese beteiligten Vorgänge zusammenfaßt, so ist eine Beeinflussung der Enzymsynthese an mindestens vier Stellen möglich:

- a. bei der Übertragung der genetischen Information innerhalb des Kerns (DNS-Stufe),
- b. bei der Übertragung der Information vom Kern auf die Ribosomen ( Messenger-RNS-Stufe ),
- c. bei der Bildung der Transfer-RNS-Aminosäure (Transfer-RNS-Stufe),
- d. bei der Übertragung der Aminosäure auf die ribosomale Peptidkette (Ribosomen-RNS-Stufe).

Da Puromycin ein Hemmer der Proteinsynthese auf der RNS-Stufe ist, Actinomycin D die Übertragung der Information schon im Kern (DNS-Stufe) blockiert, wäre aus den unter Punkt 3 (S. 48) genannten Ergebnissen zu schließen, daß Thyroxin bereits vor Übertragung der genetischen Information auf die Messenger-RNS wirkt, wie dies Lang und Sekeris z.B. für Ecdyson (127) und Cortison (86) zeigen konnten.

Zwar fanden Sokoloff et al. (132,134) eine Steigerung der Proteinsynthese durch Thyroxin, unabhängig von jeglicher Messenger-RNS-synthese, doch erstreckten sich ihre in-vitro-Versuche nur über eine halbe Stunde (134). Da etwa das 50-fache der physiologischen Konzentration des Hormons angewendet wurde,, könnte es sich bei den beobachteten, nach wenigen Minuten auftretenden Effekten

Abbildung 10 : Schematische Darstellung der Protein-  
synthese in der Leberzelle (nach 84).



Zeichenerklärung:



: DNS



: Transfer RNS



: Messenger RNS



: Aminosäuren

um unphysiologische Wirkungen des Hormons handeln, ähnlich der entkoppelnden Wirkung auf den Energiestoffwechsel(45,100). Die endgültige Beantwortung dieser Fragen muß jedoch weiteren Versuchen vorbehalten bleiben. Klar scheint bisher nur, daß die HMG-CoA-Reduktase eines der durch Thyroxin stimulierbaren Enzyme ist, das nach seiner Bildung in den Membranen des endoplasmatischen Reticulums der Leberzelle lokalisiert ist, wie auch Siperstein berichtete (129).

#### Regulation des Serumcholesterinspiegels.

Die durch Thyroxin auf diese Weise gesteigerte Cholesterinsynthese steht scheinbar im Widerspruch zu dem niedrigen Cholesterinspiegel bei Hyperthyreose. Will man jedoch den Einfluss des Thyroxins auf den Serumcholesterinspiegel und damit die in der Einleitung ausgeführte Beziehung zwischen Arteriosklerose und Schilddrüsenfunktion diskutieren, so weitet sich die Fragestellung von der Synthese auf alle den Spiegel des Cholesterins beeinflussenden Faktoren wie Abbau, Ausscheidung (170), Resorption (108,142) und Verteilung (158) aus. In einer stark vereinfachten Skizze sollen die Verhältnisse kurz dargestellt werden ( Abb. 11, Seite 53 ). Alle Faktoren, die senkend oder steigend auf den Serumcholesterinspiegel wirken können, sind durch Pfeile dargestellt. Daraus wird deutlich, daß der Serumcholesterinspiegel das Produkt einer Fülle ihn beeinflussender "Effektoren" ist. Zur Aufrechterhaltung eines konstanten Spiegels

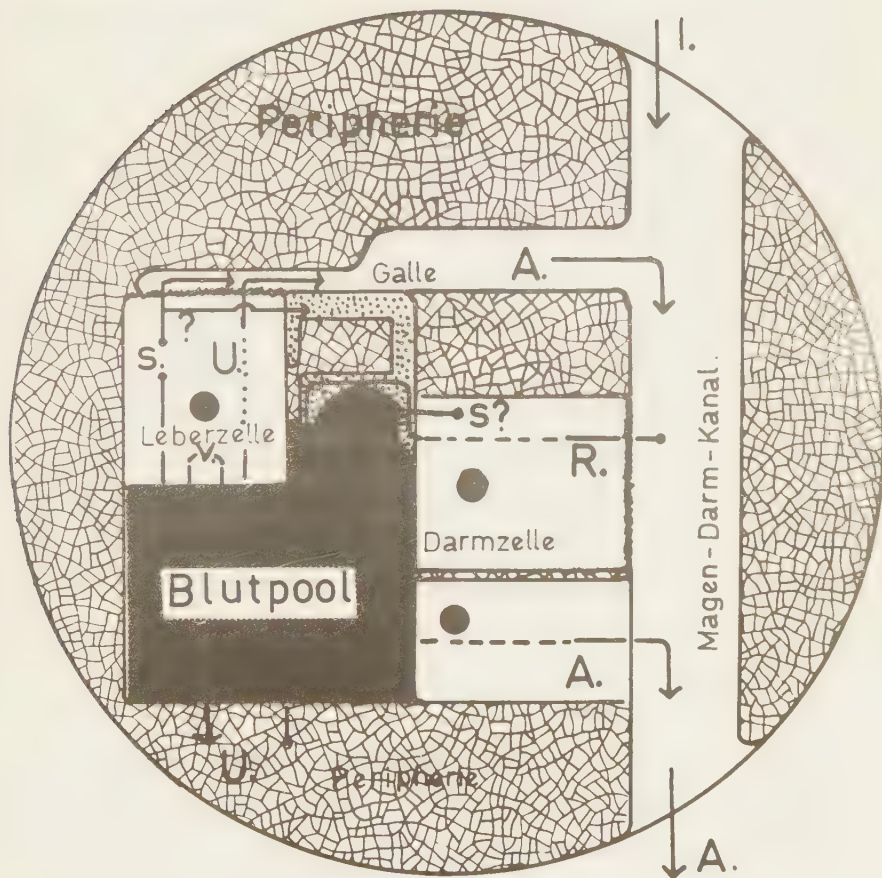
muß vorausgesetzt werden, daß alle diese Faktoren in Wechselbeziehung zueinander stehen. Für Abbau, Synthese, Resorption und Verteilung wurden solche Beziehungen aufgedeckt:

1. Sowohl Synthese wie Abbau des Cholesterins der Leber unterliegen einem Rückkopplungsmechanismus (sogenannter negativer Feedback).
  - a. Erhöhung des intrahepatischen Cholesterins durch gesteigerte Resorption oder Einlagerung aus anderen Quellen senkt die Syntheserate der Leber (8,54,129,151).
  - b. Der Abbau des Cholesterins wird durch die Gallensäuren gehemmt (6,7,29,30).
2. Zwischen Abbau und Synthese besteht eine Wechselwirkung insofern, als die beim Abbau der Steroide entstehenden Gallensäuren die Syntheserate in der Leber senken(5,109).
3. Die Höhe des Serumcholesterinspiegels geht nicht parallel mit dem Cholesterinspiegel der parenchymatösen Organe (61). Oft, wie auch bei der Hypothyreose, geht ein hoher Serumcholesterinspiegel mit einem verminderten Cholesteringehalt des Gesamtkörpers einher (18,61,158).

Diese Betrachtungen zeigen die Bedeutung des Abbaus und der Ausscheidung aus der Blutbahn für die Höhe des Serumcholesterinspiegels, der mit der intrahepatischen Cholesterinkonzentration in Beziehung steht. Rosenman et al.(121) und Weiss et al.(158) konnten nachweisen, daß Schilddrüsenhormone auch in den Abbau des Cholesterins eingreifen.

Thyreoidektomierte Tiere bauten  $^{14}\text{C}$ -Cholesterin weit lang-

Abb. 11: Schema des Cholesterinstoffwechsels.



I.: Ingestion  
 A.: Ausscheidung  
 R.: Resorption  
 S.: Synthese  
 U.: Umbau  
 V.: Veresterung

■ Blut  
 ■ Lymphe  
 ■ Gewebe

samer ab als Kontrolltiere. Durch Thyroxin ließ sich der Abbau erheblich steigern. Diese Ergebnisse liefern eine Erklärung für die Hypercholesterinaemie bei Hypothyreose, wenn man voraussetzt, daß der Einfluss des Thyroxins auf den Abbau größer ist als der auf die Synthese. Folgt man diesem Gedanken, so liegt die Vermutung nahe, daß die Wirkung des Thyroxins auf die Synthese des Cholesterins nur eine Folge der gesteigerten Abbaurrate sein könnte: Durch die verminderte Ausscheidung der Gallensäuren (158) bei Hypothyreose käme es dann zu einer Hemmung des Cholesterinabbaus (6,109); diese würde zu einem Anstieg des Cholesterins im Serum führen und rückwirkend nach den oben unter 1. a (S.52) beschriebenen Mechanismen zu einer Hemmung der Cholesterinsynthese. Bhattathiry et al. (8) konnten einen solchen Mechanismus, nämlich die Hemmung der Cholesterinsynthese durch Erhöhung des intrahepatischen Cholesterins für die alimentäre Cholesterinzufuhr nachweisen.

Andererseits zeigen die Versuche von Kattermann et al. (80) und Goorich et Harms (57) am Beispiel der Aminonucleosidnephrose der Ratte, daß ein gesteigerter Cholesterinspiegel auch mit gesteigerter Synthese einhergehen kann, die Syntheserate also höher liegt als die Abbaurrate. Diese Ergebnisse sprechen für eine primäre Wirkung des regulierenden Agens auf die Synthese in der Leber und zeigen, daß die HMG-CoA-Reduktase auch unabhängig vom

Abbau reguliert werden kann. Deshalb ist im Falle der Hypothyreose auch die Möglichkeit mehrerer Angriffspunkte des Thyroxins in Erwägung zu ziehen.

Für die arteriosklerosiefördernde Wirkung der Thyreoidektomie, die in der Einleitung erwähnt wurde, ist in erster Linie der verlangsamte Umsatz und die durch das Mißverhältnis von Abbau und Synthese bedingte Hypercholesterinaemie verantwortlich. Die Klärung des Mechanismus der Hormonwirkung wird erst nach genauer Erforschung der Zusammenhänge aller Regulationsmechanismen, die in den Cholesterinstoffwechsel eingreifen, möglich sein.

Die Steigerung der Synthese durch Gabe von Schilddrüsenhormon geht mit einer vermehrten Bildung der HMG-CoA-Reduktase einher, die, wie auch Siperstein (129) fand, in den membranösen Anteilen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist.

#### IV. Experimenteller Teil.

##### A. Haltung und Behandlung der Versuchstiere.

##### 1. Gruppenbildung.

Für alle Versuche wurden weiße Ratten der Firma Gassner, Ottobrunn bei München, verwendet.

Zwei Kollektive gleichaltriger Ratten wurden nach einem Vorschlag von H. Zucker (172) in Gruppen zu je 5 oder 6 Tieren aufgeteilt. Kollektiv I bestand aus sieben Wochen alten Tieren (150-200 g), Kollektiv II aus 50-70 g schweren Tieren (3 Wochen alt).

Nach dem Wiegen der Tiere eines Kollektivs waren diese so auf die Gruppen verteilt, daß jede Gruppe etwa gleiche Streuungen der Einzelgewichte und gleiches Gesamtgewicht hatte.

Beispiel: Kollektiv II, bestehend aus 30 drei Wochen alten Ratten.

| Tier Nr.        | Gruppe VII | VIII  | IX    | X     | XI      |
|-----------------|------------|-------|-------|-------|---------|
| 1.              | 55,6       | 52,8  | 55,7  | 54,1  | 52,2 g  |
| 2.              | 59         | 59,5  | 57,6  | 61    | 61 g    |
| 3.              | 63,6       | 62,5  | 62,5  | 63,8  | 63,4 g  |
| 4.              | 62,8       | 62,5  | 64,5  | 62,5  | 63,9 g  |
| 5.              | 67,4       | 70,5  | 68,9  | 64,7  | 64,6 g  |
| <hr/>           |            |       |       |       |         |
| Gesamtgewichte: | 308,4      | 307,8 | 309,2 | 306,1 | 305,4 g |

Die Tiere wurden gruppenweise in Plastikkäfigen unter konstanten Wärme- und Feuchtigkeitsbedingungen gehalten. Als Futter diente pulverisiertes oder pelletiertes Standardfutter (Altromin, Firma Altrogge) und Wasser ad libitum. Durch laufende Gewichtskontrollen wurden die Ernährungslage der Tiere und die Einflüsse der verschiedenen Behandlungen verfolgt (173).

## 2. Erzeugung der Hypothyreose und Hyperthyreose.

### a. Hypothyreose.

Zur Erzeugung der Hypothyreose stehen drei Methoden zur Wahl (18):

- a. Operative Thyreoidektomie,
- b. Verwendung von chemischen Thyreostatika,
- c. Ausschaltung der Schilddrüse mit  $^{131}\text{J}$ .

Wegen der einfachen Durchführbarkeit und der hohen Treffsicherheit wurde die Radiojodmethode gewählt: 50-80 g schweren Tieren injiziert man in leichter Aethernarkose 600  $\mu\text{C}$   $^{131}\text{J}$  in 0,1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung intraperitoneal (18). Durch Gewichtskontrollen (zweimal wöchentlich) verfolgt man die Wirkung der Injektion gegen eine Kontrollgruppe. Vierzehn Tage nach der Injektion muß es bei der behandelten Gruppe zu einem Wachstumsstillstand kommen, während die Kontrollgruppe normal weiterwächst. Dieser Wachstumsstillstand ist die Folge der Thyreoidektomie, nicht der Strahlenbelastung (66).

### b. Hyperthyreose.

Sowohl enterale wie parenterale Zufuhr von Schilddrüsenhormon führt zur Hyperthyreose (100).

Eine Thyreotoxikose wurde durch 15 tägige Fütterung mit Thyreoidea sicca § erreicht:

Fünf Gramm Thy. sicc. werden mit 100 Gramm pulverisiertem Standardfutter im Mörser gemischt. Vom Gemisch erhält jedes Tier 30 g pro Tag, die Kontrollgruppen die gleiche Menge Standardfutter. Durch tägliches Wiegen der Tiere und der Futterreste verfolgt man den Futterverbrauch und das Wachstum. Die Thyreotoxikose ist erreicht, wenn trotz gleichen Futterverbrauchs in der behandelten Gruppe das Gewicht ständig abnimmt.

Beim Studium der akuten Wirkungen des Schilddrüsenhormons wird Trijodthyronin<sup>§§</sup> subcutan injiziert (148). Dazu schüttelt man 10 mg 3,3',5-Trijodthyronin so lange in 100 ml Wasser, bis eine homogene Kristallsuspension entsteht. Von dieser erhält jede hypothyreote Ratte 0,5 ml (= 50 µg T<sub>3</sub>) in den Nacken injiziert. Darauf steigt das proteingebundene Jod im Serum der Tiere in wenigen Stunden auf Normalwerte an, bleibt etwa 30 - 40 Stunden konstant und fällt dann wieder auf den Ausgangswert ab.

Die Tiere einer Gruppe wurden zu verschiedenen Zeiten gespritzt und gemeinsam getötet.

---

§) Präparat: Thyreomack<sup>(1)</sup> 0,1 g Thy. sicc. pro Tbl.

§§) 3,3',5-Trijodthyronin, purissimum, Fa. Fluka, Buchs S.G.

## B. Versuche zur Bestimmung der Mevalonsäure in der Rattenleber.

### 1. Gewinnung der Leberextrakte.

Die Entnahme des Gewebes erfolgte durch Gefrierstop. Nach Eröffnung des Abdomens in leichter Aethernarkose wird die Leber mit einer vorher in flüssiger Luft abgekühlten Gewebezange abgequetscht. Nur das zwischen den Branchen der Zange sofort erstarrte Material wird, in flüssiger Luft schwimmend, in einem Mörser pulverisiert. Das Pulver gibt man unter ständiger Kühlung in einen Metallbecher mit 1 n Perchlorsäure (bei 5 g Gewebe 20 ml) und homogenisiert mit dem Ultra Turrax<sup>§</sup>, bis ein homogener Brei entstanden ist. Nach Abzentrifugieren der Zellrückstände wird der gelbe Überstand umgegossen und die überschüssige Perchlorsäure mit 5 n KOH neutralisiert. Der Niederschlag von  $\text{KClO}_4$  wird verworfen, der Überstand nach Ansäuerung auf pH 3 (2-3 Tropfen 1 n HCl) 10 - 15 Stunden im Perforator mit peroxydfreiem Aether durchperlt. Die nun im Aether befindlichen Säuren werden durch zweimaliges Ausschütteln mit 1 und 0,5 ml n/10 KOH wieder in die wässrige Phase gebracht. Von dieser wässrigen Phase wird ein Aliquot zum optischen Test gegeben.

### 2. Optischer Test zur Bestimmung der Mevalonsäure (13,91).

Die optische Bestimmung der Mevalonsäure folgt der von Henning (72) und Tschen (152) ausgearbeiteten Methode mit Mevalonatkinase.

---

<sup>§</sup>) Homogenisator, Fa. Jahnke u. Kunkel KG, Staufen i. Br.

Testzusammensetzung (91):

|                           |             |              |
|---------------------------|-------------|--------------|
| 1. Tram pH 7,45           | 0,2 M       | 1,5 ml       |
| 2. MgSO <sub>4</sub> /KCl | 1,6/0,4 M   | 0,1 "        |
| 3. PEP                    | 0,1 M       | 0,1 "        |
| 4. NADH                   | 0,02 M      | 0,02"        |
| 5. ATP                    | 0,05 M      | 0,02"        |
| 6. PK                     | krist. 1:10 | 0,01"        |
| 7. LDH                    | krist. 1:10 | 0,01"        |
| 8. Extrakt pH 7           |             | 0,1 - 0,5 ml |
| 9. H <sub>2</sub> O       |             | ad 2,3 ml    |
| 10. MVK (gereinigt s.u.)  |             | 0,02         |

Der Start der Reaktion erfolgt mit gereinigter Mevalonatkinase aus Hefe. Nach 20 Minuten Laufzeit bei 25 ° C wird die Abnahme der Extinktion gegen einen Leerwert abgelesen und das Ergebnis in  $\mu$ Mol umgerechnet. Schichtdicke d: 1 cm.

3. Reinigung der Mevalonatkinase aus Hefe (12,91).

Das Enzym wird aus 2 kg Hefe durch Toluolautolyse, Säurefällung, Geladsorption und Ammonsulfatfällung vorgereinigt (72,91). Die so erhaltenen Enzymlösungen können durch verschiedene Methoden der Ionenaustauschchromatographie weiter gereinigt werden:

I. Reinigung mit DEAE - Zellulose

II. Reinigung mit DEAE - Sephadex

a. mit Gradientenelution,

b. mit stufenweiser Elution.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Methoden versucht und miteinander verglichen.

# I. Reinigung mit DEAE-Zellulose (67).

10 g DEAE-Zellulose (Kap. 0,43) werden mit 100 ml 0,2 molarer  $K_2HPO_4$ -Lösung gemischt. Nachdem sich der Austauscher abgesetzt hat, wird der leicht trübe Überstand dekantiert. Die gebrauchsfertige Zellulose füllt man in eine gut verschlossene Flasche.

Etwa 10 ml dieser Suspension genügen zur Reinigung des Enzyms, das man aus 2 kg Hefe erhält. Diese Menge wird in ein Chromatographierrohr von 1 cm Durchmesser gefüllt und kräftig mit 0,1 m  $K_2HPO_4$ -Lösung gewaschen. Auf die so vorbereitete Säule gibt man das nach Henning (72,91) vorgereinigte Enzym, nachdem es sechs Stunden gegen 0,1 m  $K_2HPO_4$ -Lösung dialysiert wurde. Die stufenweise Elution beginnt man mit 0,05 m NaCl-Lösung in  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  0,025/0,0057 m. Mit dieser Lösung eluiert man den ersten Proteingipfel, der den größten Teil der im Enzymtest störenden ATP-ase (152) enthält. Wenn kein Eiweiß im Eluat mehr nachweisbar ist (nach etwa 30 ml), beginnt man die zweite Fraktion mit 0,118 m NaCl im gleichen Medium. Das jetzt von der Säule eluierte Protein enthält die Mevalonatkinase in 3-5 facher spezifischer Aktivität.

Die enzymhaltigen Fraktionen werden vereinigt und das Protein durch 70% Ammonsulfatsättigung präzipitiert. Der bei 20 000 g erhaltene Niederschlag wird in 0,1 m Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 aufgenommen und im Kühlschrank aufbewahrt. Das Enzym behält so seine Aktivität über mehrere Monate.

## II. Reinigung mit DEAE-Sephadex (155).

30 g DEAE-Sephadex Coarse 50 werden nach einer Vorschrift von Wachsmuth und Pfeleiderer (155) vorbereitet, indem man das Material nacheinander mit Zwischenwäschen in HCl und NaOH quellen läßt. Die Aufbewahrung ist in verschlossener Flasche über mehrere Wochen möglich.

Eine Säule von 7 mm Innendurchmesser, die durch Wasserkühlung auf 12°C gehalten wird, füllt man mit vorbereitetem Sephadex bis 27 cm Höhe und equilibriert über Nacht mit m/30 K-PO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,35. Die auslaufende Flüssigkeit wird durch ein Photometer zur Messung der Adsorption bei 253 m/μ geleitet und in 10 ml Portionen aufgefangen<sup>§</sup>.

Die nach dem Hitzeschritt (72) gegen m/30 Phosphatpuffer dialysierte Enzymlösung wird langsam auf die Säule gegeben und so lange mit Puffer nachgewaschen, bis kein Protein mehr eluiert wird. Diese erste eiweißreiche Fraktion enthält wiederum die im Test der Mevalonatkinase störende ATP-ase. Die Elution des Enzyms gelingt sowohl mit Gradientenelution wie auch mit stufenweiser Elution:

### a. Gradientenelution:

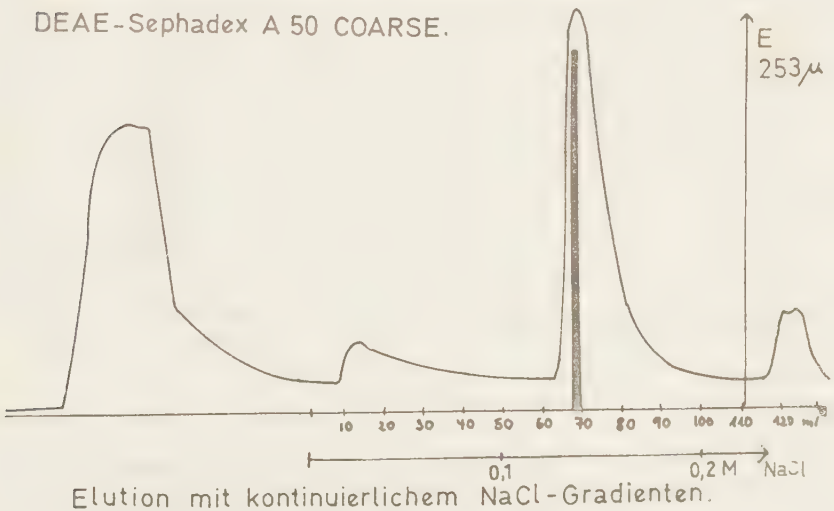
Nach Beendigung der Vorfraktion schließt man ein Gradientenmischgerät für linearen Gradienten an, das man sich aus zwei kongruenten Gefäßen, die über ein U-Rohr miteinander verbunden sind, leicht selbst herstellen kann (39).

---

<sup>§</sup> Photometer Uvicord und Fraktionensammler, LKB-Produkte

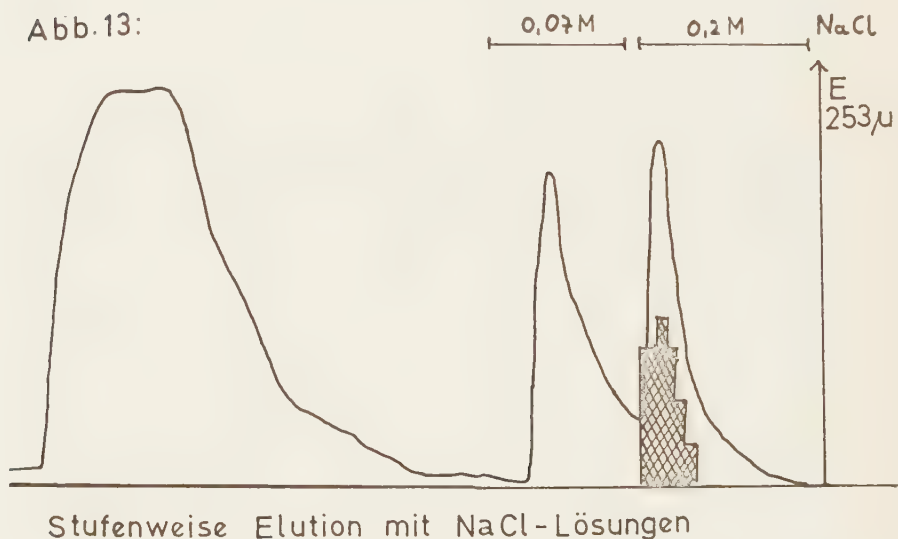
Das Mischgefäß enthält den Puffer, das Vorratsgefäß die gleiche Menge 1 m NaCl-Lösung im gleichen Puffer. Abb. 12 zeigt eine Elution mit 500 ml Mischvolumen: Die Vorfraktion enthält noch einen Rest ATPase, die zweite bei etwa 0,14 m NaCl eluierte Fraktion die Mevalonatkinase in drei- bis vierfacher Anreicherung ohne ATPase. Mit höherer Molarität eluierte proteinhaltige Fraktionen enthalten keine Enzymaktivität.

Abb.12:  
Säulenchromatographie der Mevalonatkinase auf  
DEAE-Sephadex A 50 COARSE.



b. Elution mit stufenweiser Erhöhung der NaCl-Konzentration.

Abb. 13 zeigt eine Elution mit stufenweiser Erhöhung der NaCl-Konzentration entsprechend der stufenweisen Elution von DEAE-Zellulose (S.61). Die Elution ergab ein weniger reines Enzym, das mit 0,2 m NaCl-Lösung eluiert wurde.



Das nach einer dieser Methoden weitergereinigte Enzym ist in m/30 K-PO<sub>4</sub>-Puffer nicht beständig und muß bald nach der Elution mit Ammonsulfat ausgefällt werden. Ein Vergleich der verschiedenen Elutionsmethoden zeigte, daß die Trennung auf DEAE-Zellulose die sicherste Methode ist, da auf DEAE-Seph. mehr Aktivität verloren geht ( s. Tab. F, S.65 ).

Tabelle F : Reinigung der Mevalonatkinase durch  
Sephadex - Chromatographie.

| Reinigungsschritt | Volumen | Gesamtakt. | Protein | spez. Akt. |
|-------------------|---------|------------|---------|------------|
| Nach Hitzeschritt | 41 ml   | 2200 EE    | 3,8 mg  | ,15        |
| Sephadex-Eluat    | 5,9     | 1300 EE    | 61,2    | 15,4       |
| Verlust           |         | 41 %       | 10 %    |            |

4. Infusion von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in die vena portae der narkotisierten Ratte.

Eine etwa 200 g schwere normale Ratte wird in Aethernarkose laparotomiert. Nach Orientierung über die Gefäßverhältnisse des Pfortadergebietes wird eine in der Wärme ausgezogene PVC-Kanüle in einen Hauptast der Pfortader (vena colica media oder vena mesenterica superior) eingeführt und festgebunden. Nach Anschließen der Kanüle an eine Infusionspumpe wird das  $^{14}\text{C}$ -Acetat in physiologischer Kochsalzlösung infundiert.

Dauer der Operation: 40 - 50 Minuten

Dauer der Infusion : 40 Minuten

Inhalt der Infusion: 75  $\mu\text{C}$  1- $^{14}\text{C}$ -Acetat (spez. Akt.  
20-40  $\mu\text{C}/\mu\text{M}$ ) in 0,75 ml 0,9% iger  
NaCl-Lösung.

Während der Dauer der Operation und der Infusion wird das eröffnete Abdomen mit feuchten Lappchen bedeckt und mit einer Lampe warmgehalten. Nach Beendigung der Infusionszeit

entnimmt man die Leber durch Gefrierstop und pipettiert Blutproben aus dem Herzen und der Bauchhöhle zur Bestimmung der Radioaktivität ab. Die Leber wird nach Zufügen von 50  $\mu$ mol Trägermevalonsäure wie oben beschrieben (S.59) aufgearbeitet. Dabei wird jeder Schritt durch Messung der Radioaktivität verfolgt. Der neutralisierte Aetherextrakt, welcher die freien Säuren enthält, wird über eine Celitesäule weiter aufgetrennt. Die Vorbereitung der Säule und die Elution der Mevalonsäure entsprechen dem weiter unten (S.81) beschriebenen Vorgehen beim HMG-CoA-Reduktasetest, nur werden die eluierten Fraktionen in Portionen zu 10 ml aufgefangen. Nach Beendigung der Elution mit reinem Chloroform eluiert man mit Chloroform-Butanol-Gemischen steigender Butanolkonzentration, die wie das Chloroform mit 0,4 n  $H_2SO_4$  equilibriert werden.

Von den eluierten Portionen gibt man je zwei Milliliter in ein Zählglas, gibt einen Tropfen n/10 Kalilauge dazu und trocknet die Gläschen über Nacht im Lyophilisator. Die phenolphthaleinroten Rückstände nimmt man in 10 ml Szintillationsflüssigkeit auf und bestimmt die Radioaktivität im Szintillationszähler (20). Zur Bestimmung der eluierten Säure geht man wie beim HMG-CoA-Reduktasetest vor (S.81). Zusätzlich kann die eluierte Mevalonsäure enzymatisch bestimmt werden (S.59-60). Das Ergebnis einer Auftrennung zeigt Abbildung 2, Seite 14.

C. Versuche zum HMG-CoA-Reduktasetest mit  $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA.

1. Synthese von HMG-CoA (14).

Prinzip: Das aus freier HMG-säure<sup>§</sup> durch Umsetzen mit Essigsäureanhydrid gewonnene HMG-Anhydrid wird in gepufferter Lösung mit Coenzym A zum Thioester umgesetzt.

a. HMG-Anhydrid:

200 mg HMG-säure kocht man in 10 ml wasserfreiem Benzol bei  $60^{\circ}\text{C}$  am Rückflusskühler. Nach Auflösen der Kristalle gibt man 5 ml Essigsäureanhydrid zu und läßt eine Stunde bei  $90-100^{\circ}$  kochen. Nach Abkühlung wird der Kolben mit dem Reaktionsgemisch an einen Rotationsverdampfer angeschlossen und Lösungsmittel wie restliches Essigsäureanhydrid abgezogen. Aus dem bräunlichen zähflüssigen Rückstand gewinnt man durch zweimaliges Umkristallisieren aus heißem wasserfreiem Benzol die farblosen nadelförmigen Kristalle.

Ausbeute: 45-60 mg HMG-Anhydrid.

b. HMG-CoA:

In ein eisgekühltes Reaktionsgefäß gibt man nacheinander:  
5,0 ml  $\text{H}_2\text{O}$  , 60 mg Coenzym A<sup>§§</sup>) und zur Neutralisation 0,13 ml KOH und 0,2 ml gesättigte  $\text{KHCO}_3$ -Lösung.

---

§) HMG-Acid der Firma Mann Res.

§§) Coenzym A der Fa. Boehringer, Tutzing (1 mg = 1  $\mu\text{M}$ )

Nach Prüfung des pH-Wertes (pH 7,5) und der Reaktion auf freie SH-Gruppen (65) gibt man unter ständiger  $N_2$ -Durchperlung 40 mg kristallisiertes HMG-Anhydrid zu. Nach 5 Minuten Reaktionszeit bei  $1-2^\circ C$  ist die SH-Reaktion negativ. Nach weiteren 5 Minuten säuert man mit 1 n HCl auf pH 3 an. Durch anschließende Extraktion mit Aetherperforation werden HMG-Anhydrid und restliche freie HMG-Säure entfernt. Die verbleibende HMG-CoA-Lösung wird nach optisch enzymatischer Bestimmung des Gehalts<sup>§</sup>) in der Kühltruhe bei  $-20^\circ C$  aufbewahrt.

Ergebnis: HMG-CoA-Lösung mit  $2,6-3,3/\mu M$  HMG-CoA/ ml.

## 2. Synthese von $5-^{14}C$ -HMG-CoA.

Prinzip: Um markiertes HMG-CoA möglichst hoher spezifischer Aktivität zu erhalten, wurde beta-methylcrotonyl-CoA enzymatisch mit  $^{14}C$ -Carbonat carboxyliert und durch Wasseranlagerung in  $5-^{14}C$ -HMG-CoA übergeführt (siehe Gleichungen S. 16). Diese Methode folgt dem von Lynen et al (74,82,97) beschriebenen Weg.

### a. $\beta$ -Methylcrotonylanhydrid (119).

$\beta$ , $\beta$ -Dimethylacrylsäure<sup>§§</sup> purum wird einmal aus heißem Wasser umkristallisiert. Es entstehen lange weiße Nadeln.

---

§) Die Gehaltsbestimmungen der HMG-CoA-Lösungen wurden freundlicherweise von Fräulein Coy, der ich an dieser Stelle herzlich danken möchte, durchgeführt. Zur Bestimmung wurde hochgereinigte HMG-CoA-Reduktase aus Hefe verwendet.

§§)  $\beta$ , $\beta$ -Dimethylacrylsäure purum, Fa. Fluka, Buchs, S.G.

Die Synthese des Anhydrids ist nur aus dem Säurechlorid und dem Kaliumsalz möglich (119).

Kaliumsalz: 10 g kristalliner Dimethylacrylsäure werden in 30 ml Methanol gelöst und mit klarem KOH-gesättigten Methanol versetzt, bis pH 8,5 erreicht ist. Nach Trocknung im Lyophilisator setzt sich das weiße Kaliumsalz in Krusten ab.  
Ausbeute: 10 g.

Säurechlorid: 10 g Dimethylacrylsäure (krist.) werden in einem 100 ml - Rundkolben mit 13,5 ml wasserfreiem Petrolaether versetzt und gelöst. Danach wird der Kolben unter dem Abzug an einem Rückflusskühler befestigt, durch den man langsam 13,5 ml Thionylchlorid eintropfen läßt. Nach Beendigung der anfangs heftigen Reaktion erwärmt man vorsichtig auf 60°C und läßt das Gemisch eine halbe Stunde reagieren. Durch Vakuumdestillation bei 40°C und 11 mm Hg entfernt man das entstandene Dimethylacrylsäurechlorid. Ausbeute: 5,8 ml.

Dimethylsäureanhydrid: In einem 100 ml Reaktionskolben mit aufgesetztem Rückflusskühler gibt man nacheinander:

1. 12 g Dimethylacrylsäurechlorid,
2. 10 ml Petrolaether und
3. 14 g Kaliumdimethylacrylat.

Das heftig reagierende Gemisch läßt man unter Erwärmen auf 60°C drei Stunden kochen. Durch anschließende fraktionierte Vakuumdestillation trennt man das entstandene Anhydrid vom restlichen Säurechlorid und freier Säure. Im Verlauf der Fraktionierung erhält man vier Fraktionen:

| Fraktion                      | Temperatur | Druck | Kühlung           | Kühltemperatur |
|-------------------------------|------------|-------|-------------------|----------------|
| 1. Petrolaether               | 25         | 18    | fließendes Wasser | —              |
| 2. Dimethylacrylsäurechlorid  | 60         | 12    | stehendes Wasser  | 25             |
| 3. Dimethylacrylsäure         | 110-120    | 10    | Luft §            | 95-110         |
| 4. Dimethylacrylsäureanhydrid | 160-165    | 10    | Luft              | 125-130        |

§ Um ein Erstarren der Fraktion 3 im Kühler zu verhindern, muß nach Überdestillieren des Säurechlorids (meist sehr wenig) das Wasser aus dem Kühler entfernt werden und dieser langsam auf 110° erhitzt werden.

Man erhält 10 ml Dimethylacrylsäureanhydrid, das im Gegensatz zur freien Säure bei 100° noch flüssig ist.

b.  $\beta$ -Methylcrotonyl-CoA (82).

Wie bei der Synthese von HMG-CoA (S.67) versetzt man 50 mg CoA in neutraler gepufferter Lösung unter N<sub>2</sub>-Durchperlung mit 0,5 ml Dimethylacrylsäureanhydrid

bis zur negativen SH-Reaktion. Nach Entfernung von überschüssigem Anhydrid durch Aetherextraktion trocknet man das Gemisch im Lyophilisator und erhält ein weißes Pulver. Ausbeute: 20  $\mu$ Mol Methylcrotonyl-CoA (enzymatisch gemessen) bei Einsatz von 45  $\mu$ Mol Coenzym A.

Der Gehalt des Praeparates an biochemisch aktivem Methylcrotonyl-CoA wurde mit Methylcrotonyl-CoA-carboxylase aus *Achromobacter aerogenes* (75) im kombinierten optischen System nach Knappe et al. (81) bestimmt §.

Durchführung des Tests:

Man gibt in eine 1 cm Cuvette:

|                                 |              |                     |
|---------------------------------|--------------|---------------------|
| 1. Tris pH 8,0                  | 1,0 M        | 0,2 ml              |
| 2. MgCl <sub>2</sub>            | 1,0 M        | 0,15 ml             |
| 3. ATP                          | 0,1 M        | 0,01 ml             |
| 4. PEP                          | 0,01 M       | 0,1 ml              |
| 5. KHCO <sub>3</sub>            | 0,1 M        | 0,1 ml              |
| 6. NADH                         | 0,01 M       | 0,03 ml             |
| 7. Albumin                      | 10mg/ml      | 0,01 ml             |
| 8. LDH                          | Krist-Susp.  | 0,01 ml             |
| 9. IK                           | Krist.-Susp. | 0,01 ml             |
| 10. $\beta$ -Methylcr.CoA-carb. |              | 0,01 ml             |
| 11. H <sub>2</sub> O            |              | ad 2,0 ml (mit 12.) |

---

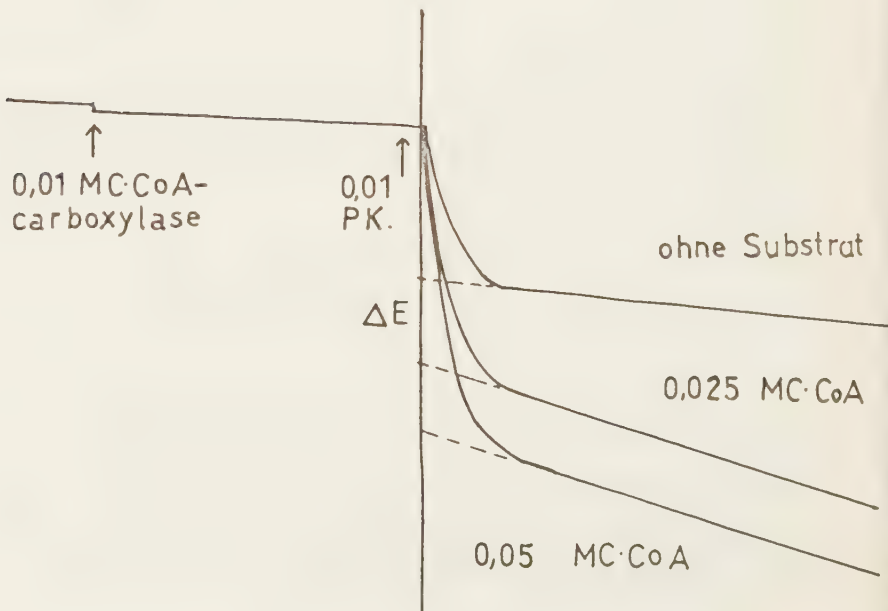
Start mit Substratlösung:  $\beta$ -MC-CoA                      0,01 - 0,05 ml

---

§ Die gereinigten Enzyme aus *Achromobacter aerogenes* wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. F. Lynen zur Verfügung gestellt.

Nach dem Start läßt man 20 Minuten reagieren und liest dann das entstandene  $\Delta E$  gegen einen Leerwert ab. Die Beurteilung wird sicherer durch Verkürzung der Reaktionszeit. Diese kann durch Vorinkubation des Substrats mit Carboxylase erreicht werden: Nach 10 Minuten Vorinkubation wird mit Pyruvatkinase gestartet. Der dabei entstehende Lauf ohne Substrat (s. Abb. 14) ist auf eine Verunreinigung des verwendeten ATP-präparates mit ADP zurückzuführen.

Abb. 14: Optisch enzymatische Bestimmung von  $\beta$ -Methylcrotonyl-CoA.



c. Synthese von 5- $^{14}\text{C}$ -HAG-CoA (75,116).

Prinzip: Das nach b. erhaltene  $\beta$ -Methylcrotonyl-CoA wird mit markiertem Bicarbonat, Cofaktoren und einem Enzymgemisch aus *achromobacter aerogenes* (75), das sowohl Methylcrotonyl-CoA-carboxylase wie Methylglutaconase (75) enthält, umgesetzt. Dabei entsteht als Zwischenprodukt  $^{14}\text{C}$ -Methylglutaconyl-CoA (siehe Gleichungen S. 16).

In ein Reaktionsgefäß gibt man zusammen:

|                                                  |              |                      |         |
|--------------------------------------------------|--------------|----------------------|---------|
| 1. Tris pH 7,5                                   | 1,0 M        | 800/ $\mu\text{M}$   | 0,8 ml  |
| 2. $\text{MgCl}_2$                               | 1,0 M        | 20/ $\mu\text{M}$    | 0,02 ml |
| 3. Mg-ADTA                                       | 0,1 M        | 2/ $\mu\text{M}$     | 0,02 ml |
| 4. Albumin                                       | 10 mg/ml     | 0,4 mg               | 0,04 ml |
| 5. ATP                                           | 0,1 M        | 4/ $\mu\text{M}$     | 0,04 ml |
| 6. $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3/\text{KOH}$ §)    | 0,025/0,05 M | 25/50/ $\mu\text{M}$ | 1,0 ml  |
| 7. $\beta$ -MC-CoA §§)                           | 0,004 M      | 3,2/ $\mu\text{M}$   | 0,8 ml  |
| 8. $\text{H}_2\text{O}$                          |              |                      | 5,23 ml |
| 9. Enzymgemisch aus <i>achromob. aerog.</i> (82) |              |                      | 0,05 ml |

Volumen: 8,0 ml , Reaktionszeit: 1-2 Stunden, Temp.:  $32^\circ\text{C}$ .

---

§)  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  wurde aus  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  (spez.Akt. 30-36/ $\mu\text{C}/\mu\text{M}$ ) durch Austreiben des  $^{14}\text{CO}_2$  und Wiederauffangen im Warburggefäß erhalten.

§§) Da die  $\beta$ -MC-CoA-Lösung carbonatfrei sein muß, wird sie angesäuert, 20 Minuten mit  $\text{N}_2$  durchperlt und nach Neutralisation mit carbonatfreier KOH ihr Gehalt bestimmt.

Nach Beendigung der Reaktion wird unter dem Abzug in einem geschlossenen System das überschüssige  $^{14}\text{CO}_2$  ausgetrieben und in einem laugehaltigen Einsatz aufgefangen. Nach Erreichen einer konstanten Radioaktivität wird das Reaktionsgemisch durch Zentrifugieren von dem gleichzeitig ausgefällenen Protein befreit. Der klare Überstand kann zum Test verwendet werden.

Ausbeute: 8 ml einer HMG-CoA-Lösung mit  $1,5 \cdot 10^5$  Ipm/0,01 ml.  
Die Aufbewahrung erfolgt bei pH 5,5 und  $-20^\circ\text{C}$ .

d. Identifizierung des Reaktionsproduktes als  $^{14}\text{HMG-CoA}$ .

I. Papierchromatographischer Nachweis.

0,01 ml des Reaktionsproduktes wird mit  $1/\mu\text{m}$  kaltem HMG-CoA auf einen Papierstreifen<sup>8</sup> aufgetragen und nach 90 Minuten Vorinkubation in der Chromatographierkammer im Stadtmangemisch (139) 24 Stunden lang aufsteigend chromatographiert (140,157). Durch UV-Absorption, verzögerte SH-Reaktion und Messung der Radioaktivität im Radiopapierchromatographen (75) ergibt sich eine einheitliche Bande, deren  $R_f$ -Wert nahe bei dem des reinen CoA ist, das gleichzeitig mitchromatographiert wurde (37).

Lynen et.al.(97) fanden bei der Papierchromatographie der freien Säuren des Reaktionsproduktes nach alkalischer Verseifung in Isoamylformiat-Ameisensäure-Wasser (11:2:1) zwei radioaktive Gipfel.

<sup>8</sup>) Papier: Schleicher und Schüll 2043 b.

## II. Celitechromatographie.

Um die bei der Papierchromatographie der freien Säuren des Reaktionsproduktes (97) gefundenen beiden radioaktiven Gipfel zu identifizieren, wurde die Celitechromatographie benutzt(143).

0,05 ml des Reaktionsproduktes werden durch Zugabe von 0,45 ml 1n KOH verseift und nach 30 Minuten Reaktionszeit mit 1n HCl neutralisiert.

Man mischt 1 ml des neutralen Hydrolysats,

1 mg HMG-Säure,

1 ml 1 n  $H_2SO_4$ ,

2 g Celite §

in einem 100 ml - Becherglas. Das feuchte Pulver gibt man auf eine vorbereitete, mit 0,4 n  $H_2SO_4$  equilibrierte 6g-Celitesäule (Vorbereitung s.S.80) und packt es zu einer festen Schicht. Die Elution erfolgt mit einem Chloroform - Butanol - Gemisch (82:18), das nach Equilibrieren mit 0,4 n  $H_2SO_4$  auf die Säule gegeben wird. Das Eluat fängt man in Portionen von 10 ml auf. Jede Portion wird nach Zugabe von 10 ml Wasser am Rotationsverdampfer eintrotiert und die freie, jetzt in der wässrigen Phase enthaltene Säure durch Titration mit 0,01 m KOH bestimmt. Ein Aliquot wird zur Messung der Radioaktivität genommen. Nach Messung der Radioaktivität ergeben sich zwei Gipfel (s. Abb.15,S.79), von denen der zweite sich mit dem titrierten Säuregipfel deckt. Dieser Gipfel enthält 55 % der Radioaktivität.

---

§ Celite 345 , Fa. Serva

mit der Menge der Wiedergefundenen (a) und der Messung der Radioaktivität (Aa) der reinen, spezifischen Radioaktivität (Ab) des synthetischen HMG nach dem Riek'schen Prinzip berechnen:

1. Die spezifische Radioaktivität ist die Radioaktivität pro Menge.
2. Die spezifische Radioaktivität vor der Trennung ist gleich der spezifischen Radioaktivität nach der Trennung.

Dies bedeutet:

$$(1) \quad C = \frac{Xm}{m}$$

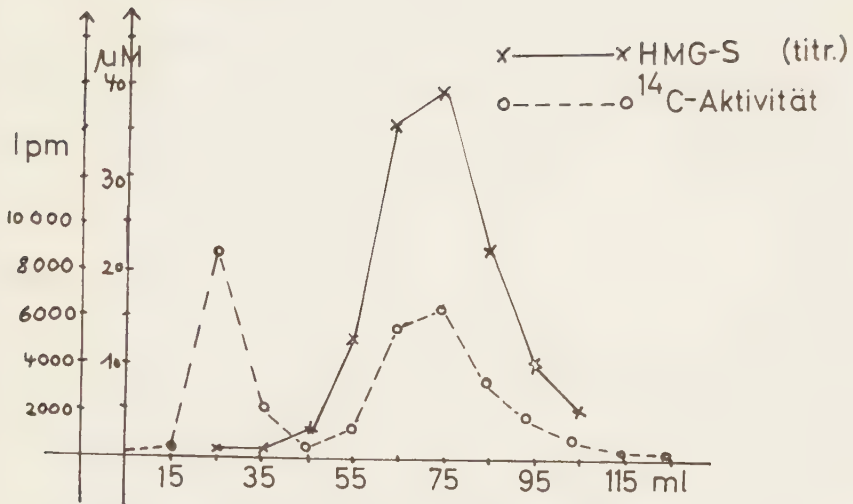
$$(2) \quad \frac{Xm}{m + a} = \frac{Xb}{b}$$

Xm : 55 % der Ipm  
(nur HMG-säure)  
vor Trennung  
m : z. z. z. Menge  
HMG-säure  
a : Zugesezte "kalte"  
HMG-säure  
b : Wiedergefundene  
HMG-säure (titriert)  
Xb : Wiedergefundene  
Ipm in der HMG-  
säurefraktion.

Beide Formeln löst man nach m auf, setzt sie gleich und löst dann nach C auf. Man erhält dann die Formel, in der nur noch C unbekannt ist und aus den Messwerten berechnet werden kann:

$$(3) \quad C = \frac{Xm \cdot Xb}{Xb \cdot b - Xb \cdot a}$$

Abb. 15:



Celite-Chromatographie von  $^{14}\text{C}$ -HMG-Säure.

3. HMG-CoA-Reduktasetest mit 5- $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA (117).

Prinzip:

Durch Homogenisieren und fraktioniertes Zentrifugieren gewinnt man Lebermikrosomen, in denen die HMG-CoA-Reduktase enthalten ist. Die gewonnene Mikrosomensuspension wird in geeignetem Medium mit radioaktivem HMG-CoA inkubiert. Nach Ablauf einer Stunde wird die Reaktion gestoppt und die entstandene  $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure durch Celitechromatographie abgetrennt. Die Menge des pro Zeiteinheit gebildeten Mevalonats ist ein Maß für die Aktivität des Enzyms in Lebermikrosomen.

### Gewinnung der Mikrosomensuspension aus Leber:

Die Leber wird in leichter Aethernarkose entnommen und mit der Schere in gekühltem Mikrosomenmedium zerschnitten. Zusammensetzung des Mediums:

|                          | g/Liter | Molarit. |
|--------------------------|---------|----------|
| Sucrose                  | 34,2    | 0,1      |
| KCl                      | 3,715   | 0,05     |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 5,45    | 0,04     |
| Aqua dest. ad 1000 ml    |         |          |

Zu 1 g Leber gibt man 2 ml dieses Mediums und homogenisiert 2 Min. im Potter Plastikhomogenisator. Durch 10 Min. Zentrifugieren bei  $10^4$  g werden Zellreste, Kerne und Mitochondrien entfernt. Den trüben Überstand gießt man in ein Spinco-Zentrifugenröhrchen und schleudert ihn eine Stunde bei 105 000 g in der Ultrazentrifuge ab. Der dabei entstehende dreischichtige Niederschlag (s.Photo I-III, S.32) enthält die Mikrosomen in der mittleren, dunkelroten Schicht. Diese wird vorsichtig von der unteren Glykogenschicht getrennt und mit Hilfe eines Schüttlers in wenig Medium resuspendiert. Durch Messung des Proteingehalts (11) und Verdünnung mit Medium stellt man eine für den Test fertige Suspension her, deren Proteingehalt auf 5 mg pro ml eingestellt wird.

### Ausführung des Enzymtestes:

Die Mikrosomensuspension wird mit 5- $^{14}\text{C}$ -HMG-CoA in einem Medium inkubiert, in dem ständig NADPH nachgeliefert wird und so eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit der HMG-CoA-

# Ausführung des Enzymtestes:

Die Mikrosomensuspension wird mit 5-<sup>14</sup>C-HMG-CoA in einem Medium inkubiert, in dem ständig NADPH nachgeliefert wird, und so eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit der HMG-CoA-Reduktase gewährleistet ist.

## Zusammensetzung des Testes:

| Substanz                                               | Stammlösung  | im Test                       |           | Endkonzentration |
|--------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------|-----------|------------------|
|                                                        | / $\mu$ l/ml | ml                            | / $\mu$ l | / $\mu$ l/ml     |
| 1. Tris HCl<br>pH 7,2                                  | 1000         | 0,1                           | 100       | 100              |
| 2. K-EDTA<br>pH 7,0                                    | 1000         | 0,02                          | 20        | 20               |
| 3. Cystein-HCl<br>pH 7,2                               | 100          | 0,1                           | 10        | 10               |
| 4. Albumin<br>( in mg)                                 | 10           | 0,05                          | 0,5       | 0,5              |
| 5. G-6-P pH 7,2                                        | 100          | 0,1                           | 10        | 10               |
| 6. NADP                                                | 20           | 0,05                          | 1         | 1                |
| 7. G-6-PDH<br>(mg/ml)                                  | 2            | 0,01                          | 0,02      | 0,02             |
| 8. HMG-CoA                                             | 3            | 0,05                          | 0,15      | 0,15             |
| 9. 5- <sup>14</sup> C-HMG-CoA<br>(30 $\mu$ C/ $\mu$ M) |              | 2 $\cdot$ 10 <sup>5</sup> IPM |           |                  |
| 10. Mikrosomen<br>(mg/ml)                              | 5            | 0,2-0,4                       | 1-2       | 1-2              |
| 11. Medium                                             |              | ad 1 ml                       |           |                  |

Reaktionszeit 60 Minuten bei einer Temperatur von 37° Celsius.

Von jeder Mikrosomensuspension setzt man zwei Teste an. Der erste wird mit 0,2, der zweite mit 0,4 ml Mikrosomensuspension gestartet. Nach Ablauf einer Stunde gibt man in jedes Röhrchen 50  $\mu$ Mol unmarkierte Mevalonsäure als Träger und stellt das Teströhrchen drei Minuten in ein kochendes Wasserbad. Nach Denaturierung des Proteins führt man den gesamten Inhalt des Röhrchens quantitativ in ein 100 ml Becherglas über, neutralisiert mit 1n KOH bis zum Phenolphthaleinumschlagspunkt und trocknet die Probe über Nacht im Gefriertrockner.

Abtrennung der Mevalonsäure durch Celitechromatographie:

a. Packen der Säule(48,143):

Eine Chromatographiersäule mit Fritte (  $\varnothing$  15-18 mm ) und aufgesetztem Rundkolben (200 ml) wird bis in die Glaskugel hinein mit Toluol gefüllt, und unter der Fritte befindliche Luft durch Auf- und Abziehen eines passenden Glasstabes entfernt.

In ein 100 ml Becherglas wiegt man 6 g Celite<sup>§</sup> ein und gibt mit der Pipette 3 ml 0,4n  $H_2SO_4$  zu. Die Säure wird mit dem Spatel in das Celite eingerührt, bis eine homogene Masse entstanden ist. Diese Masse gibt man in die mit Toluol gefüllte Säule, homogenisiert sie mit dem Glasstab und packt sie fest auf die Fritte.

---

<sup>§</sup> Celite Serva 535, mit HCl und Aether gereinigt.

b. Auftragen der Probe:

Zu der trocken aus dem Lyophilisator entnommenen Probe gibt man 0,5 ml 1n Schwefelsäure, fügt 1 g Celite hinzu und rührt alles wie unter a. zu einem homogenen Gemisch, das auf die vorbereitete Säule gepackt wird. Die fertige Säule wird oben mit einem Glaswattestopfen abgeschlossen und das überstehende Toluol dekantiert.

c. Elution der Mevalonsäure:

Die Mevalonsäure kann mit Chloroform eluiert werden (83), das vorher mit 0,4 n  $H_2SO_4$  equilibriert ist.

Dazu mischt man pro Säule 120 ml Chloroform mit der gleichen Menge 0,4 n  $H_2SO_4$  und schüttelt im Scheidetrichter kräftig durch. Nach Trennung der beiden Phasen filtriert man die Chloroformphase durch ein Faltenfilter und gibt sie auf die Säule. Nach Öffnung des Hahns erscheint die Mevalonsäure zwischen 30 und 110 ml Elutionsvolumen. (s. Abb 2, S. 14) Diese Fraktion fängt man in zwei Portionen à 40 ml auf.

Messung der Mevalonsäure:

Durch Titration wird die zugefügte Trägermevalonsäure im Eluat bestimmt (die im Test gebildete Mevalonsäure fällt titrimetrisch nicht ins Gewicht), durch Messung der Radioaktivität erhält man die spezifische Aktivität, die proportional mit der HMG-CoA-Reduktaseaktivität im Test ansteigt.

Zur Titration muß die als Lacton vorliegende Mevalonsäure in die wässrige Phase zurückgebracht werden. Dies erreicht man durch Zugabe von 10 ml aqua dest. und Einrotieren der Probe am Rotationsverdampfer. Durch Erwärmen auf 50° C bricht man das Lacton auf und kann es leicht mit n/100 Kalilauge titrieren. Als Indikator dient Phenolphthalein. 1 ml verbrauchter Lauge entspricht 10  $\mu$ Mol Lacton. Im Idealfall findet man in jeder der eluierten Portionen 20 - 25  $\mu$ Mol. Nach beendeter Titration rotiert man die Probe bei 40°C am Vakuumverdampfer zur Trockne ein. Der Rückstand wird in 2,5 ml Wasser aufgenommen; davon gibt man 2 ml in ein Zählglas, fügt 10 ml Scintillationsflüssigkeit nach Bray (20) zu und bestimmt die Radioaktivität der Mevalonsäurefraktion im Szintillationszähler.

#### Auswertung der Ergebnisse:

Die in zwei ml gemessene Radioaktivität (IpM) wird mit 1,25 multipliziert (Gesamtmenge 2,5 ml) und durch die bei der Titration ermittelte Menge Säure dividiert. Die so erhaltene spezifische Radioaktivität der Mevalonsäure steigt proportional mit der Enzymaktivität, da die im Test entstehende Mevalonsäure mengenmäßig gegenüber den zugefügten 50  $\mu$ Mol nicht ins Gewicht fällt. Eine Kontrolle bietet in jedem Falle der Doppelversuch mit 1 und zwei mg Mikrosomenprotein.

Will man die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in internationalen Einheiten (1  $\mu$ M/mg Protein  $\cdot$  Stunde) angeben,

so muß man die gesamte im Test gebildete Radioaktivität berechnen. Dazu dient die zugegebene konstante Menge Mevalonsäure als Leitgröße. Aus der Menge der bei der Titration wiedergefundenen Säure kann ich auf die am Ende des Testes vorhandene Aktivität schließen. Da die spezifische Radioaktivität der entstehenden Mevalonsäure der des verwendeten HMG-CoA entspricht, ( $2 \cdot 10^5$  Ipm/150 m/ $\mu$ M) erhalte ich aus der gemessenen Radioaktivität die m/ $\mu$ M/h. Bei Messungen des Proteingehalts der verwendeten Mikrosomen läßt sich das Ergebnis dann auf mg Mikrosomenprotein und auf Gramm Leber beziehen.

#### 4. Gewinnung mikrosomaler Untereinheiten im Sucrose- dichtegradienten.

##### I. Vorschrift nach Fouts (53):

###### Prinzip:

Eine Mikrosomensuspension wird über eine höher konzentrierte Sucroselösung geschichtet. Beim hochtourigen Zentrifugieren wandern die spezifisch schwereren Partikel der Suspension in das dichtere Medium, während die leichteren Teile an der Grenzschicht der beiden Medien liegen bleiben.

Ein 5 ml Zentrifugenröhrchen<sup>§</sup> wird mit 1 ml 1,31 molarer Sucroselösung beschickt und mit 4 ml einer Mikrosomensuspension (s.S.78) in 0,13 m Sucrose überschichtet.

---

<sup>§</sup> Plastikröhrchen für Rotor SW 39 der Spinco Ultrazentr.

Nach zwölfstündigem Zentrifugieren bei  $10^5g$  haben sich zwei Schichten gebildet: Neben dem am Boden des Röhrchens liegenden "Pellet" sieht man an der Grenze zwischen dem etwas trüben dichten und dem klaren leichten Medium eine zweite dünne Zwischenschicht. Diese wird durch vorsichtiges Abpipettieren gewonnen, in ein zweites Zentrifugenröhrchen überpipettiert und, gemeinsam mit dem aufgewirbeltem Pellet, eine weitere Stunde bei  $10^5g$  zentrifugiert. Von beiden so gewonnenen Niederschlägen stellt man wie oben beschrieben (S.78) Resuspensionen her, bringt sie auf gleichen Proteingehalt und setzt sie in den HMG-CoA-Reduktasetest ein.

## II. Vorschrift nach Dallner (34,35):

### Prinzip:

Die Trennungsmethode Dallners unterscheidet sich nur durch die Anwesenheit von Magnesiumionen während der Trennung. Diese verursachen eine Aggregation der ribosomalen Elemente, machen sie so spezifisch schwerer und erlauben eine raschere und sauberere Trennung.

- a. In einer 0,25 M Sucroslösung, die 0,01 M  $MgCl_2$  enthält, stellt man sich eine Mikrosomensuspension her.
- b. In ein 11,5 ml Zentrifugenröhrchen<sup>§</sup> pipettiert man 4,5 ml
- c. 1,3 M Sucroslösung mit 0,01 M  $MgCl_2$  und überschichtet mit 7 ml der unter a. hergestellten Suspension.

Nach 30 Minuten Zentrifugieren bei  $10^5g$  erhält man zwei klar voneinander getrennte Schichten, die man wie unter I. voneinander trennt und resuspendiert (s. Abb 9, S.35).

---

<sup>§</sup>Röhrchen für Rotor 40 der Spinco Ultrazentrifuge.

D. Statistische Berechnung.

1. Die Standardabweichung  $s$  wurde aus der Streuung  $s^2$  errechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x^2) - \bar{x} \cdot \sum (x)}{N - 1}}$$

$\sum (x^2)$ : Summe der Quadrate der Einzelwerte

$\bar{x}$ : arithmetischer Mittelwert der Einzelwerte

$\sum (x)$ : Summe der Einzelwerte

$N$ : Anzahl der Messungen

2. Zur Bestimmung der Signifikanz  $p$  diente der Prüfquotient  $t$  der Studentverteilung:

$$t = \frac{d}{S_d}$$

$d$ : Differenz der Mittelwerte zweier Reihen

$S_d$ : Gemeinsame Standardabweichung der Reihen

$S_d$  läßt sich aus den Streuungen der einzelnen Reihen errechnen:

$$S_d = \sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}$$

Aus dem so gewonnenen  $t$  wurde in der Tabelle der Signifikanzschranken der Studentverteilung die Signifikanz  $p$  gewonnen. Dabei war  $\nu = N_1 + N_2 - 2$ .

Aus: Geigy: Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, S 32-35, 160-1.

### Z u s a m m e n f a s s u n g :

1. Mit einem optisch enzymatischen und einem Isotopentest wird versucht, den Mevalonsäurespiegel der Rattenleber zu messen. Mit beiden Methoden läßt sich freie Mevalonsäure in der Leber nicht nachweisen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Arbeiten, deren Ergebnisse auf unspezifische Begleitreaktionen zurückgeführt werden. In dem negativen Ergebnis bestätigt sich die Anschauung, daß die HMG-CoA-Reduktase das limitierende Enzym der Cholesterinsynthese darstellt.
2. Mit Hilfe von synthetisiertem 5-<sup>14</sup>C-HMG-CoA wird das Enzym HMG-CoA-Reduktase in Rattenlebermikrosomen gemessen. In Übereinstimmung mit anderen Autoren findet sich eine sehr geringe Aktivität dieses Enzyms von 45,6 mE pro Gramm Leber. In einem Milligramm Mikrosomenprotein, dem Träger des Enzyms, sind durchschnittlich 3,6 mE enthalten. Mitochondrien und lösliche Fraktion enthalten nur Spuren von Enzymaktivität.
3. Messungen der HMG-CoA-Reduktase bei Hypothyreose zeigen eine Senkung der Aktivität durch die mit <sup>131</sup>I durchgeführte Thyreoidektomie. Die Aktivität sinkt auf 40 % des Ausgangswertes, teilweise auf unter 10 %.
4. Messungen des Enzyms in der isolierten perfundierten Rattenleber zeigen einen starken Abfall der Aktivität auf Werte unter 10 % des Ausgangswertes im Verlaufe der Perfusion. Auch durch Zufuhr von Trijodthyronin zum Perfusionsmedium läßt sich dieses Verhalten nur wenig beeinflussen. In jedem Falle beträgt die Aktivität nach 4 Stunden weniger als 50 % des Ausgangswertes.

5. Durch einmalige Injektion von 50  $\mu$ g Trijodthyronin in hypothyreote Tiere läßt sich die Enzymaktivität wieder steigern. Etwa 35 Stunden nach Applikation des Hormons kommt es zu einem schnellen Anstieg der Aktivität auf Werte oberhalb des Normbereichs. Nach Erreichen eines Plateaus sinkt die Aktivität später wieder im Verlauf von Tagen auf die Ausgangsaktivität ab.
  6. Bei der Fraktionierung der Mikrosomenfraktion durch Sucroседichtegradienten läßt sich nachweisen, daß die HMG-CoA-Reduktase in den Membranen des mit Ribosomen besetzten endoplasmatischen Retikulums enthalten ist. Die einzelnen Subfraktionen werden elektronenoptisch auf ihre Reinheit geprüft.
  7. Unter Berücksichtigung der Literatur über den Cholesterinstoffwechsel werden die Ergebnisse gedeutet und ihre Bedeutung für die Regulation des Serumcholesterinspiegels diskutiert.
-

#### IV

Die vorliegende Arbeit konnte nur durch die großzügige Unterstützung von Herrn Prof. Dr. O. Wieland zustande kommen. Ich möchte ihm an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen. Nach Überlassung des Themas hat er meine Arbeit durch ständige Beratung und Hilfe wesentlich gefördert.

Ebenso möchte ich mich für die Hilfe aus anderen Instituten, die mir durch seine Vermittlung zuteil wurde, bedanken:

Herrn Prof. Dr. F. Lynen, Max Planck Institut für Zellchemie, München, bin ich für die Überlassung gereinigter Enzyme und praeparativer wie analytischer Methoden zu großem Dank verpflichtet. Daneben möchte ich Herrn Dr. D.M. Regen, Dep. of Physiol., Nashville, Tenn., für seine Einführung in die Celitechromatographie und die Überlassung seiner Methode herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. F. Miller, Path. Inst. der Universität München, sage ich Dank für die Herstellung elektronenoptischer Praeparate und die Überlassung der Photos für diese Arbeit, ohne die eine wesentliche Aussage nicht möglich gewesen wäre.

Für technische Hilfen danke ich Herrn Dr. L. Weiß, Herrn Dr. I. Tonkaboni und Frau Dr. I. Nolte.

Ausserdem danke ich allen, die durch Ratschläge, Diskussion und Kritik meine Freude an der Arbeit vermehrt haben.

Während der Durchführung der Experimente wurde mir von der Deutschen Forschungsgemeinschaft eine finanzielle Unterstützung zuteil, für die ich zu besonderem Dank verpflichtet bin.

Walter Guder

L i t e r a t u r :

1.      Abrikosoff, A.L.:  
Anatomische Befunde in einem Fall von Myxoedem.  
Virchows Arch. 177, 426, (1904)
2.      Agranoff, B.W., H. Eggerer, U. Henning and F. Lynen:  
Biosynthesis of Terpenes:  
VII. Isopentenylpyrophosphate Isomerase.  
J. biol. Chem. 235, 326, (1960)
3.      Agranoff, B.W., H. Eggerer, U. Henning and F. Lynen:  
Isopentenylpyrophosphate Isomerase.  
J. amer. chem. Soc. 81, 1254, (1959)
4.      Barker, S.B.:  
Peripheral actions of thyroid hormones.  
Fed. Proc. 21, 635, (1962)
5.      Beher, W.T., G.D. Baker and W.L. Anthony:  
Effect of dietary cholic acid on in vivo cholesterol  
metabolism.  
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 100, 3, (1959)
6.      Beher, W.T., G.D. Baker:  
Inhibition of cholesterol biosynthesis by cholic  
acid.  
Amer. J. Physiol. 197, 1339, (1959)
7.      Bergström, S. and H. Danielson:  
On the regulation of bile acid formation in rat liver.  
Acta physiol. scand. 43, 1, (1958)
8.      Bhattathiry, E.P.M. and M.D. Siperstein:  
Feedback control of cholesterol synthesis in man.  
J. clin. Invest. 42, 1613, (1963)

9. Bing, H.I. und H.Heckscher:  
Eine Mikromethode zur Messung der Fettmenge des Blutes.  
Biochem.Z, 149, 79, (1924)
10. Bing, H.I. und H. Heckscher:  
Fett-Cholesteringehalt des Blutes bei Morbus Basedowii.  
Biochem. Z. 158, 403, (1925)
11. Biuret-Methode:  
Photometer Eppendorf Ringbuch E<sub>1</sub>/1-3
12. Bloch, K.:  
The biological conversion of cholesterol to  
pregnanendiol.  
J. biol. Chem. 157, 661, (1945)
13. Bloch, K.:  
The biological synthesis of cholesterol.  
Vitamins Hormones, N.Y. 15, 119, (1957)
14. Bloch, K., B.N. Berg and D. Rittenberg:  
The biological conversion of cholesterol to cholic acid.  
J. biol. Chem. 149, 511, (1943)
15. Bloch, K., S. Chaykin, A.H. Phillips and A. de Waard:  
Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate.  
J. biol. Chem. 234, 2595, (1959)
16. Bloch, K., C. Clark and J. Harary:  
Utilization of branched chain acids in cholesterol  
synthesis.  
J. biol. Chem. 211, 687, (1954)
17. Bloch, K., D.Rittenberg:  
On the utilization of acetic acid for cholesterol  
formation.  
J. biol. Chem. 145, 625, (1942)
18. Boyd, G.S.:  
Thyroid function, thyroxin analogs, and cholesterol  
metabolism in rats and rabbits.  
in  
Hormones and Atherosclerosis, A.P. 1959, S. 49
19. Boyd, G.S. and M.F. Oliver:  
Brit. med. Bull. 16, 138, (1960)
20. Bray, G.:  
A simple efficient liquid scintillator for counting  
aqueous solutions in a liquid scintillation counter.  
Anal. Biochem. 1, 279, (1960)
21. Breusch, F. und H. Thiersch:  
Der Einfluß des Jods auf die Kaninchenatheromatose.  
Z. ges. exp. Med. 95, 458, (1935)

## VII

22. Brady, R.O. and S.J. Gurin:  
Biosynthesis of labelled fatty acids and cholesterol  
in experimental diabetes.  
J. biol. Chem. 187, 589, (1950)
23. Bucher, N.:  
Persönliche Mitteilung.
24. Bucher, N.L.R. and K. Mc Garrahan:  
The biosynthesis of cholesterol from acetate-1-<sup>14</sup>C  
by cellular fractions of rat liver.  
J. amer. chem. Soc. 75, 489, (1953)
25. Bucher, N.L.R., K. Mc Garrahan, E. Gould and A.V. Loud:  
Cholesterol biosynthesis in preparations of livers from  
normal, fasting, x-radiated, cholesterol-fed, triton-,  
or delta-4-cholesten-3-one treated rats.  
J. biol. Chem. 234, 262, (1959)
26. Bucher, N.L.R., P. Overath and F. Lynen:  
Enzymes controlling cholesterol biosynthesis of fasting  
rats.  
Fed. Proc. 18, 20, (1959)
27. Bucher, N.L.R., G.E.W. Wolstenholme and M. oConnor:  
Alterations of cholesterol biosynthesis in liver cell  
fractions from rats in various experimental conditions.  
in  
" Biosynthesis of Terpenes and Sterols"  
Ciba Foundation Symposium, 46 Boston 1959
28. Bucher, N.L.R., P. Overath and F. Lynen:  
β-HMG-CoA-Reductase, cleavage and condensing enzymes  
in relation to cholesterol-formation in rat liver.  
Biochim. Biophys. Acta 40, 491, (1960)
29. Byers, S.O., M. Friedmann and F. Michaelis:  
Observations concerning the production and excretion of  
cholesterol in mammals: I. Plasma cholesterol after bile  
duct ligation and free cholesterol injection.  
J. biol. Chem. 184, 71, (1950)
30. Byers, S.O., M. Friedman and F. Michaelis:  
Observations concerning the production and excretion of  
cholesterol in mammals: III. The source of excess plasma  
cholesterol after ligation of the bile duct.  
J. biol. Chem. 188, 637, (1951)
31. Chaikoff, I.L., M.D. Siperstein, W.G. Dauben, H.L. Bradlow,  
J.F. Eastham, G.M. Tomkins, J.R. Meier, R.W. Chen, S. Hotta  
and P.A. Srere:  
<sup>14</sup>C-Cholesterol: II. Oxidation of carbons 4 and 26 to carbon  
dioxide by the intact rat.  
J. biol. Chem. 194, 413, (1952)

# VIII

32. Conradi, B.G.F.:  
Dissertatio sistens experimenta nonnulla cum calculis  
vesiculae felleae humana instituta.  
Diss. Jena 1775.  
in: Thesaurus Dissert. Med. Rariorum 1, 191 (1784)
33. Cornforth, J.W., R.H. Cornforth, G. Popjak and I.Y. Gore:  
Studies on the biosynthesis of cholesterol:  
5. Biosynthesis of squalene from d,1,3<sup>4</sup>hydroxy-3 methyl-  
(2 <sup>14</sup>C)-pentano-5-lactone.  
Biochem. J. 69, 146, (1958)
34. Dallner, G.:  
Studies on the structural and enzymatic organization of  
the membraneous elements of liver microsomes.  
Acta path. microbiol. scand. Suppl. 166 (1963)
35. Dallner, G., S. Orrenius and A. Bergstrand:  
Isolation and properties of rough and smooth  
vesicles from rat liver.  
J. Cell Biol. 16, 426, (1963)
36. Dam, H.:  
Cholesterinbilanz des Hühnchens in den ersten  
zwei Lebenswochen.  
Biochem. Z. 232, 269, (1931)
37. Decker, K.:  
Die aktivierte Essigsäure.  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1959
38. Dituri, F., J.L. Rabinowitz, R.P. Hullin and S. Gurin:  
Precursors of squalene and cholesterol.  
J. biol. Chem. 229, 825, (1957)
39. Dorfner, K.:  
Stand und neuere Entwicklung der Gradientenelution.  
Chemiker-Zeitung 87, 871, (1963)
40. Drochmans, P.:  
Morphologie du glycogène: Etude au microscope électronique  
de colorations negatives du glycogène particulaire.  
J. Ultrastruct. Res. 6, 141, (1962)
41. Durr, I.F., Rodney, H.:  
The reduction of 8-hydroxy-methyl-glutaryl-coenzym A  
to mevalonic acid.  
J. biol. Chem. 235, 2572 (1960)
42. Eggerer, H. und F. Lynen:  
Zur Biosynthese der Terpene: VIII. Synthese von 3-Isopentenyl-  
pyrophosphat.  
Ann. Chem. 630, 58, (1960)
43. v. Eiselsberg, A.F.:  
Wachstumsstörungen bei Tieren nach frühzeitiger  
Schilddrüsenexstirpation.  
Arch. Klin. Chir. 49, 207, (1895)

## IX

44. Elwood, J.C. and J.T. van Bruggen:  
Cholesterol and mevalonate metabolism: A time course study in vivo.  
J. Lip. Res. 2, 344, (1961)
45. Ernster, L. and R. Luft:  
Mitochondrial respiratory control.  
in Advances in Metabol. Disord. 1, 109 (1964)
46. Felts, Ph. and O. Wieland:  
Functional integrity of the citrate condensing step in ketosis.  
Unveröffentlicht
47. Ferguson, J.J., I.F. Durr and H. Rudney:  
Enzymatic reduction of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) to mevalonic acid in yeast.  
Fed. Proc. 17, 219, (1958)
48. Ferguson, J.J., I.F. Durr and H. Rudney:  
The biosynthesis of mevalonic acid.  
Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 45, 499, (1959)
49. Fletscher, K. and N.B. Myant:  
Influence of the thyroid on the synthesis of cholesterol by liver and skin in vitro.  
J. Physiol., London 144, 361, (1958)
50. Fletscher, K. and N.B. Myant:  
Effects of thyroxine on the synthesis of cholesterol and fatty acids by cell-free fractions of rat liver.  
J. Physiol., London 154, 145, (1960)
51. Fleischmann, W.B. and H.B. Shumacker jr.:  
The relationship between serum cholesterol and total body cholesterol in Hyper- and hypothyroidism.  
Bull. John Hopkins Hosp. 71, 175, (1942)
52. de Fourcroy:  
De la substance feuilletée et cristalline contenue dans les calculs biliaires, et de la nature des concrétions cystiques cristallisées.  
Ann. chim. 3, 242, (1789)
53. Fouts, J.R.:  
The metabolism of drugs by subfractions of hepatic microsomes.  
Bioch. Biophys. Res. Comm. 6, 373, (1961)
54. Frantz, I.D. jr, H.S. Schneider and B.T. Hinkelman:  
Suppression of hepatic cholesterol synthesis in the rat by cholesterol feeding.  
J. biol. Chem. 206, 465, (1954)

55. Freemann, K.B., D.B. Roddyn and J.R. Tata:  
Stimulation of amino acid incorporation into protein by isolated mitochondria from rats treated with thyroid hormones.  
Bioch. Biophys. Acta 72, 129, (1963)
56. Gamble, J.L., and K.D. Blackfan:  
Evidence indicating a synthesis of cholesterol by infants.  
J. Biol. Chem. 42, 401, (1920)
57. Goodrich, I. and W.S. Harms:  
Synthesis of endogenous cholesterol in experimental nephrosis.  
Metabolism 13, 141, (1964)
58. Gordon, A.H. and J.H. Humphrey:  
Method for measuring rates of synthesis of albumin by the isolated perfused rat liver.  
Bioch. J. 75, 240, (1960)
59. Gould, R.G.:  
Origin of Plasma cholesterol using carbon  $^{14}\text{C}$ .  
Fed. Proc. 10, 191, (1951)
60. Gould, R.G.:  
Biosynthesis of Cholesterol.  
in Cholesterol, R.P. Cook (Editor), 210, A.P. 1958
61. Gould, R.G.:  
The relationship between thyroid hormones and cholesterol biosynthesis and turnover.  
in "Hormones and Atherosclerosis", A.P. 1959, S. 75
62. Gren:  
Zerlegung eines Gallensteins.  
Beiträge zu den chem. Ann. v. Lorenz Crell, Leipzig 1789
63. Gries, F.A., F. Matschinsky und O. Wieland:  
Induktion der  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-Reduktase durch Schilddrüsenhormone.  
Bioch. Biophys. Acta 56, 615, (1962)
64. Gries, F.A., F. Matschinský und O. Wieland:  
Die Steuerung der Cholesterinsynthese durch thyroxin-abhängige Enzyminduktion.  
9. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Wiesbaden 1962, 149  
Springer- Verlag, Berlin 1963
65. Grunert, H.H. and P.H. Phillips:  
A modification of the nitroprusside method of analysis for glutathione.  
Arch. Biochem. Biophys, 30, 217, (1951)

66. Hagemann, E.:  
Ratte und Maus, Versuchstiere in der Forschung.  
de Gruyter, Berlin 1960
67. Haynes, D.:  
Studies on mevalonic acid.  
unveröffentlicht
68. Hamprecht, B.:  
Persönliche Mitteilung.
69. Heckscher, H.:  
Fett-Cholesterinmenge des Blutes bei Kretinen.  
Biochem. Z. 158, 422. (1925)
70. Heckscher, H.:  
Untersuchungen über den Fettcholesteringehalt  
des Blutes bei thyreoidektomierten Pferden.  
Biochem. Z. 158, 417, (1925)
71. Hellig, H.R. and K. Savard:  
Biosynthesis of progesterone, sterols and squalene  
from acetate-1-<sup>14</sup>C and mevalonate-2-<sup>14</sup>C by the bovine  
corpus luteum in vitro.  
J. Biol. Chem. 240, 1957, (1965)
72. Henning, U.:  
Darstellung der Mevalonsäurekinase aus Hefe.  
in Hoppe - Seyler / Thierfelder 10. Aufl., Bd. VI A, S.161  
Springer Verlag, Heidelberg 1965
73. Henning, U.:  
Bestimmung der Mevalonsäure mit Mevalonsäurekinase.  
ebenda
74. Himes, R., J. Knappe, E. Ringelmann and F. Lynen:  
Methylglutaconase, eine neue Hydratase, die am Stoffwechsel  
verzweigter Carbonsäuren beteiligt ist.  
Biochem. Z. 229, 476, (1958)
75. Himes, R.H., D.L. Young, E. Ringelmann and F. Lynen:  
The biochemical function of biotin:  
V. Further studies on  $\beta$ -methylcrotonyl-CoA carboxylase.  
Biochem. Z. 337, 48, (1963)
76. Hoelzer, H.:  
Über Arteriosklerose im Kindesalter bei angeborenem  
vollkommenem Schilddrüsenmangel; zugleich ein Beitrag  
zur Funktion der Schilddrüse und zur Arteriosklerose.  
Beitr. path. Anat. 104, 289, (1940)
77. Holdsworth, E.S., E. Neville and C. Nader:  
The metabolism of acetate in the sheep.  
Biochim. biophys. Acta 86, 240, (1964)

## XII

78. Hun, H. and T.M. Prudden:  
Myxedema, four cases with two autopsies; with a report of the microscopical examination.  
Amer. J. med. Sci. 96, 1, (1888)
79. Jovanović, M., D. Djurdjević and J. Sinadinović:  
Effect of large doses of radiiodine on thyroid function.  
Acta endocrin., 48, 1, (1965)
80. Kattermann, R., W. Reutter und K. Decker:  
Über die Cholesterinsynthese bei der Aminonucleosidnephrose der Ratte.  
Klin. Wschr. 43, 393, (1965)
81. Knappe, J., E. Ringelmann und F. Lynen:  
Zur Biosynthese der Terpene: IX. Über die  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-Reduktase der Hefe.  
Biochem. Z. 332, 195, (1959)
82. Knappe, J., H.G. Schlegel und F. Lynen:  
Zur biochemischen Funktion des Biotins: I. Die Beteiligung der  $\beta$ -Methyl-crotonyl-Carboxylase an der Bildung von  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA aus  $\beta$ -Hydroxyisovaleryl-CoA.  
Biochem. Z. 335, 101, (1961)
83. Knauss, H.J., J.W. Porter and G. Wasson:  
The biosynthesis of mevalonic acid from 1- $^{14}$ C-acetate by a rat liver enzyme system.  
J. biol. Chem. 234, 2835, (1959)
84. Knedel, M.:  
Beziehungen zwischen Ultrastruktur und Biochemie in der Leberzelle.  
in "Leber, Haut und Skelett." S.229, Thieme, Stuttgart 1964.
85. Kritchevsky, D., J.L. Moynihan, J. Langan, S.A. Tepper and M.L. Sachs:  
Effects of d- and l-thyroxin and of d- and l- 3,5,3'-trijodthyronine on development and regression of experimental atherosclerosis in rabbits.  
J. Atheroscler. Res. 1, 211, (1961)
86. Lang, N. und C. Sekeris:  
Zum Wirkungsmechanismus der Hormone: III. Einfluß von Cortisol auf den RNS- und Proteinstoffwechsel in Rattenlebern.  
Z. phys. Chem. 339, 238, (1964)
87. Langhans:  
Anatomische Beiträge zur Kenntnis der Kretinen.  
Virchows Arch. 149 (1897)
88. Lecanu, L.R.:  
Etudes chimiques sur le sang humain.  
Ann. chim. phys. 67, 54, (1838)

# XIII

89. Levy, H.R. and G. Popjak:  
Mevalonic kinase and phosphomevalonic kinase from liver.  
Biochem. J. 75, 417, (1960)
90. Lindsey, C.A.jr. and J.D. Wilson:  
Evidence for a contribution by the intestinal wall  
to the serum cholesterol of the rat.  
J. Lip. Res. 6, 173, (1965)
91. Löffler, G.:  
Zum Mechanismus der Acetessigsäure- und Cholesterin-  
bildung bei experimenteller Ketose.  
Diss. München 1961
92. Luck, D.J.L.:  
Glycogen synthesis from uridine diphosphate glucose.  
The distribution of the enzyme in liver cell fractions.  
J. biophys. biochem. Cytol. 10, 195, (1961)
93. Lynen, F.:  
Die Biosynthese der Terpene.  
Chem. Weekblad 43, 581, (1960)
94. Lynen, F., H. Eggerer, U. Henning und I. Kessel:  
Zur Biosynthese der Terpene: III. Farnesyl-pyrophosphat  
und 3-Methyl-delta3-butenyl-1-pyrophosphat, die biologi-  
schen Vorstufen des Squalens.  
Angew. Chem. 70, 738, (1958)
95. Lynen, F. und U. Henning:  
Über den biologischen Weg zum Naturkautschuk.  
Angew. Chem. 72, 820, (1960)
96. Lynen, F., U. Henning, C. Bublitx, B. Sörbo und L. Kröplin-  
Rueff:  
Der chemische Mechanismus der Acetessigsäurebildung  
in der Leber.  
Biochem. Z. 330, 269, (1958)
97. Lynen, F., J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting, E. Ringelmann  
und J.P. Lachance:  
Zur biochemischen Funktion des Biotins: II. Reinigung und Wir-  
kungsweise der  $\beta$ -Methyl-crotonyl-Carboxylase.  
Biochem. Z. 335, 123, (1961)
98. Lynen, F., L. Wessely, O. Wieland und L. Rueff:  
Zur  $\beta$ -Oxydation der Fettsäuren.  
Angew. Chem. 64, 687, (1952)
99. Marchand, F.J.:  
Über einen Fall von sporadischem Kretinismus und Myxoedem  
mit fast totaler Aplasie der Schilddrüse.  
Münch. med. Wschr. 53, 1440, (1906)

100. Martius, C. und B. Hess:  
Über den Wirkungsmechanismus des Schilddrüsenhormons.  
Biochem. Z. 326, 191, (1955)
101. Mason, R.L., H.M. Hunt and L. Hurxthal:  
Blood cholesterol values in hyperthyroidism  
and hypothyroidism- their significance.  
New Engl. J. Med. 203, 1273, (1930)
102. Matschinsky, F., U. Meyer und O. Wieland:  
Die Wirkung des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin  
auf die isolierte Rattenleber.  
Biochem. Z. 333, 48, (1960)
103. Meier, J.R., M.D. Siperstein and I.L. Chaikoff:  
 $^{14}\text{C}$  - Cholesterol: IV. Oxydation of carbons 4 and 26  
to carbon dioxide by surviving tissues.  
J. biol. Chem. 193, 105, (1952)
104. Merkel, H.:  
Über Gefäßveränderungen bei dystopischem Hypothyreoidismus.  
Beitr. path. Anat. 104, 332, (1940)
105. Michels, R., J. Cason and L. Sokoloff:  
Thyroxine: Effects on amino acid incorporation into  
protein in vivo.  
Science 140, 1417, (1963)
106. Milch, L.J., B.S. Schlesinger, W.C. Filsinger and H.M. Hughes:  
The conversion of  $^{14}\text{C}$ -acetate to cholesterol in the  
euthyroid and hypothyroid dog.  
in G. Pincus: Hormones and Atherosclerosis, S.63, A.P. 1959
107. Miller, L.L., C.G. Bly, M.L. Watson and W.F. Bale:  
The dominant role of the human liver in plasma  
protein synthesis.  
J. exp. Med. 94, 431, (1951)
108. Mueller, J.H.:  
The assimilation of cholesterol and his esters.  
J. biol. Chem. 22, 1, (1915)
109. Myant, N.B. and H.A. Eder:  
The effect of biliary drainage upon the synthesis  
of cholesterol in liver.  
J. Lip. Res. 2, 363, (1961)
110. Nejad, N.S. and I.L. Chaikoff:  
Effect of glucocorticoids and l-thyroxine on acetate carbon  
incorporation into cholesterol by livers of hypophysecto-  
mized rats.  
Endocrinology 75, 396, (1964)
111. Nolte, I.:  
Unveröffentlicht
112. Page, I.H. and W. Menschik  
The destruction of cholesterol by the animal organism.  
J. biol. Chem. 97, 359, (1932)

113. Palade, G.E. and P. Siekevitz:  
Liver microsomes.  
J. biophys. biochem. Cytol. 2,2, 171, (1956)
114. Popjak, G. and M.L. Beeckmans:  
Extrahepatic lipid synthesis.  
Biochem. J. 47, 233, (1950)
115. Porter, K.R.:  
The ground substance. Observations from elektrone  
microscopy.  
in "The Cell", II, 621, A.P. N.Y. 1961
116. Regen, D.M.:  
Persönliche Mitteilung.
117. Regen, D.M., Ch. Riepertinger, B. Hamprecht and F. Lynen:  
The Measurement of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methyl-glutaryl-CoA  
reductase in rat liver; effects of fasting and refeeding.  
Biochem. Z. 346, 78, (1966)
118. Reiner, J.M.:  
The study of metabolic turnover rates by means of iso-  
topic tracers.  
Arch. Biochem. Biophys. 46, 53, (1953)
119. Ringelmann, E.:  
Persönliche Mitteilung.
120. Rittenberg, D. and R. Schoenheimer:  
Deuterium as an indicator in the study of intermediary  
metabolism: XI. Further studies on the biological up-  
take of deuterium into organic substances with special  
reference to fat and cholesterol formation.  
J. biol. Chem. 121, 235, (1937)
121. Rosenman, R.H., S.O. Byers and M. Friedman:  
The mechanism responsible for the altered blood  
cholesterol content in deranged thyroid states.  
J. clin. Endocrin. 12, 1287, (1952)
122. Rudney, H.:  
The biosynthesis of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaric acid.  
J. biol. Chem. 227, 303, (1957)
123. Schettler, G.:  
Hypothyreotische Hypercholesterinaemie.  
in Hdb. Inn. Med., 4.Aufl. Bd VII/2, 697, Springer, 1955
124. Schoenheimer, R.:  
Versuch einer Sterinbilanz an der legenden Henne.  
Z. phys. Chem. 185, 119, (1929)
125. Schoenheimer, R. and F. Breusch:  
Synthesis and destruction of cholesterol in the organism.  
J. biol. Chem. 103, 439, (1935)

126. Scriba, P.C., R. Landgraf, H.G. Heinze und K. Schwarz:  
Bestimmung der Bindung von Trijodthyronin an  
Serumproteine mittels Dextrangelfiltration.  
Klin. Wschr. 44, 69, (1966)
127. Sekeris, C.E.:  
Action of ecdysone on RNA and protein metabolism  
in the bow fly, *calliphora erythrocephala*.  
in "Mechanism of Hormone Action", 149, Thieme Stuttgart 1965
128. Siperstein, M.D. and I.L. Chaikoff:  
<sup>14</sup>C-Cholesterol:  
III. Excretion of carbons 4 and 26 in feces, urine and bile.  
J. biol. Chem. 198, 83, (1952)
129. Siperstein, M.D. and V.M. Fagan:  
Studies on the feedback regulation of cholesterol synthesis.  
Adv. Enzym. Regul., II, 249, (1964)
130. Siperstein, M.D. and M.J. Guest:  
Studies on the site of the feedback control of  
cholesterol synthesis.  
J. clin. Invest. 39, 642, (1960)
131. Siperstein, M.D. and D.V. laMarr:  
Control of cholesterol synthesis in normal,  
regenerating and malignant liver.  
Proc. V. Intern. Congr. Biochem., Moscow 1961, p. 632.
132. Sokoloff, L., C.M. Francis and Ph.L. Campbell:  
Thyroxin stimulation of amino acid incorporation into protein  
independent of any action on messenger RNA synthesis.  
Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 52, 728, (1964)
133. Sokoloff, L. and S. Kaufmann:  
Thyroxin stimulation of amino acid incorporation into protein.  
J. biol. Chem. 236, 795, (1961)
134. Sokoloff, L., S. Kaufmann, P.L. Campbell, C.M. Francis  
and H.V. Gelboin:  
Thyroxin stimulation of amino acid incorporation  
into protein. Localization of stimulated step.  
J. biol. Chem. 238, 1432, (1963)
135. Sonderhoff, R. und H. Thomas:  
Die enzymatische Dehydrierung der Trideutero-essigsäure.  
Ann. Chem. 530, 195, (1937)
136. Sperry, W.M., and R.W. Angevine:  
Lipid excretion: IX. The secretion of lipids into  
the intestine.  
J. biol. Chem. 96, 769, (1932)
137. Srere, P.A., I.L. Chaikoff and W.G. Dauben:  
The in vitro synthesis of cholesterol from acetate  
by surviving adrenal cortical tissue.  
J. biol. Chem. 170, 829, (1948)

# XVII

139. Stadtman, E.R.:  
The net enzymatic synthesis of acetyl-CoA.  
J. biol. Chem. 196, 535, (1952)
140. Stadtman, E.R. and H.A. Barker:  
Fatty acid synthesis by enzyme preparations of clostridium  
cluyveri: VI. Reaction of acyl-phosphates.  
J. biol. Chem. 184, 769, (1950)
141. Struck, E., und O. Wieland:  
Zur Bedeutung der Pyruvatcarboxylase als Schrittmacher  
der Glukoneogenese.  
Diabetol. 1, 81, (1965)
142. Swell, L., E.C. Trout jr., H. Field jr. and C.R. Treadwell:  
The role of lymph cholesterol in the regulation of endo-  
genous cholesterol ester synthesis.  
J. biol. Chem. 230, 631, (1958)
143. Swim, H.E. and M.F. Utter:  
Isotopic experimentation with intermediates of the  
tricarboxylic acid cycle.  
in S.P. Colowick and N.O. Kaplan:  
Methods in Enzymology, Vol IV, 584, A.P. New York 1957.
144. Tata, J.R.:  
Inhibition of the biological action of thyroid hormones  
by actinomycin D. and puromycin.  
Nature, London 197, 1167, (1963)
145. Tata, J.R.:  
Accelerated synthesis and turnover of nuclear and cyto-  
plasmatic RNA during the latent period of action of  
thyroid hormone.  
Biochim. Biophys. Acta 87, 528, (1964)
146. Tata, J.R.:  
Basal metabolic rate and thyroid hormones.  
Adv. Metabol. Disord. 1, 153, (1964)
147. Tata, J.R.:  
Thyroid hormones and regulation of protein synthesis.  
in " Mechanism of Hormone Action", 173, Thieme, Stuttgart 65
148. Tata, J.R., L. Ernster and O. Lindberg:  
Control of basal metabolic rate by thyroid hormones  
and cellular function.  
Nature, London 193, 1058, (1962)
149. Tata, J.R., L. Ernster, O. Lindberg, E. Arrhenius,  
S. Pedersen and R. Hedman:  
The action of thyroid hormones at the cell level.  
Biochem. J. 86, 408, (1963)

150. Tavormina, P.A., M.H. Gibbs and J.W. Huff:  
The utilization of 3-hydroxy-3-methyl-delta-valerolactone  
in cholesterol biosynthesis.  
J. amer. chem. Soc. 78, 4498, (1956)
151. Tomkins, G.M., H. Sheppard and I.L. Chaikoff:  
Cholesterol synthesis by liver:  
III. its regulation by ingested cholesterol.  
J. biol. Chem. 201, 187, (1963)
152. Tschen, T.T.:  
Mevalonic kinase from yeast.  
J. biol. Chem. 233, 1100, (1958)
153. Turner, K.B.:  
Studies on the prevention of cholesterol atherosclerosis  
in rabbits: I. The effect of whole thyroid and of  
potassium iodide.  
J. exper. Med. 58, 115, (1933)
154. Turner, K.B., C.H. Present and E.H. Bidwell:  
The role of the thyroid in the regulation of blood  
cholesterol of rabbits.  
J. exp. Med. 67, 111, (1938)
155. Wachsmuth, E.D. und G. Pfeleiderer:  
Biochemische Untersuchungen an kristallinen Isoenzymen  
der Lactatdehydrogenase aus menschlichen Organen.  
Biochem. Z. 336, 545, (1963)
156. Wegelin, C.:  
Zur Kenntnis der Kachexia thyreopriva.  
Virchows Arch. 254, 698, (1924)
157. Weiß, L.:  
Über das Verhalten der aktivierten Essigsäure der Leber  
bei experimenteller Ketose.  
Diss. München 1963
158. Weiss, S.B. and W. Marx:  
The fate of radioactive cholesterol in mice with  
modified thyroid activities.  
J. biol. Chem. 213, 349, (1955)
159. Weiss, W.P. and L. Sokoloff:  
Reversal of thyroxin induced hypermetabolism by puromycin.  
Science 140, 1324, (1963)
160. Widnell, C.C. and J.R. Tata:  
Stimulation of nuclear RNA polymerase during the latent  
period of action of thyroid hormones.  
Biochim. Biophys. Acta 73, 506, (1963)
161. Wieland, H. und E. Dane:  
Untersuchungen über die Konstitution der Gallensäuren:  
Zur Kenntnis der 12-oxy-Cholansäure.  
J. biol. Chem. 210, 269, (1933)

# XIX

162. Wieland, O. und I. Eger-Neufeldt:  
Zur Hemmung der Lipoidsynthese der Leber beim Diabetes.  
Biochem. Z. 337, 349, (1963)
163. Wieland, O., G. Löffler, L. Weiß und I. Neufeldt:  
Zur Acetessigsäure- und Cholesterinbildung bei  
experimenteller Ketose.  
Biochem. Z. 333, 10, (1960)
164. Wieland, O. und I. Neufeldt:  
Zur Cholesterin- und Fettsäuresynthese in der diabetischen  
Rattenleber.  
Z. physiol. Chem. 324, 101, (1961)
165. Windaus, A.:  
Über die quantitative Bestimmung des Cholesterins  
in einigen normalen und pathologischen Nieren.  
Z. physiol. Chem. 65, 110, (1960)
166. Windaus, A.:  
Über den Gehalt normaler und atheromatöser Aorten  
an Cholesterin und Cholesterinestern.  
Z. physiol. Chem. 67, 174, (1910)
167. Windaus, A.:  
Über die Konstitution des Cholesterins und der Gallensäuren.  
Z. physiol. Chem. 213, 147, (1932)
168. Wolf, D.E., C.H. Hofmann, P.E. Aldrich, H.R. Skeggs,  
L.D. Wright and K. Folkers:  
β-Hydroxy-β-methyl-δ-valerolactone (divalonic acid),  
a new biological factor.  
J. amer. chem. Soc. 78, 4499, (1956)
169. Wong, R.K.L. and J.T. van Bruggen:  
Lipide metabolism in the diabetic rat: I. Acetate  
metabolism and lipide synthesis in vivo.  
J. biol. Chem. 235, 26, (1960)
170. Wong, R.K.L. and J. T. van Bruggen:  
Lipide metabolism in the diabetic rat: II. Cholesterol  
turnover studies.  
J. biol. Chem. 235, 30, (1960)
171. Zaffaroni, A., O. Hechter and G. Pincus:  
Adrenal conversion of <sup>14</sup>C-labelled cholesterol  
and acetate to adrenal cortical hormones.  
J. amer. chem. Soc. 73, 1390, (1958)
172. Zucker, H.:  
Persönliche Mitteilung.
173. Zucker, H.:  
Die Bedeutung der Ernährung für die Ratte als Versuchstier.  
in Weihe: Die Umwelt der Versuchstiere und ihre Standardi-  
sierung im biologischen Test.

Lebensdaten:

- Walter Guder,  
 geboren am 7. 1. 1938 in Krauthausen bei Düren, 2. Sohn des  
 technischen Direktors Walter Guder und seiner Frau Irma, ge-  
 borene Dresel.
- 1944-49: Besuch der Volksschule in Kreuzau bei Düren , Rhld.
- 1949-58: Besuch des städtisch naturwissenschaftlichen Gym-  
 nasiums in Düren, Rhld..
- 1958-59: Beginn des Medizinstudiums an der Universität Köln.
- 1959-61: 4.-6. Semester Medizinstudium in Tübingen.
- 1961-64: 7.-11. Semester Medizinstudium in München.
- 1964 : Beendigung des Staatsexamens am 6. März 1964.
- 1964-65: Medizinalassistentenzeit in der biochemischen Abtei-  
 lung der II. Med. Universitätsklinik in München.
- 1965-66: Medizinalassistentenzeit in der klinischen Abteilung  
 der II, Medizinischen Universitätsklinik München  
 (6 Monate), in der chirurgischen Abteilung des  
 Kreiskrankenhauses Wasserburg (4 Monate) und der  
 Privatfrauenklinik Dr. v. Weidenbach, München (4 Mon.).

Die vorliegende Arbeit entstand während der Medizinalassistenten-  
 zeit 1964-1966.







